



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

ANA CAROLINI CAVALLIERI ZATTA

**INFLUÊNCIA DA DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E DOS
ASPECTOS FENOLÓGICOS DE *Tithonia diversifolia* HEMSL. A.
GRAY (ASTERACEAE) NA SUA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E
ATIVIDADE BIOLÓGICA**

VITÓRIA,

2026

ANA CAROLINI CAVALLIERI ZATTA

**INFLUÊNCIA DA DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E DOS
ASPECTOS FENOLÓGICOS DE *Tithonia diversifolia* HEMSL. A.
GRAY (ASTERACEAE) NA SUA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E
ATIVIDADE BIOLÓGICA**

Dissertação de Mestrado 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 Mestre em Biologia Vegetal.

Área de concentração: Fisiologia Vegetal.

Orientador(a): Prof.^a. Dr.^a Maria do Carmo Pimentel
Batitucci

VITÓRIA - ES

2026

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

Z11i Zatta, Ana Carolini Cavallieri Zatta, 1998-
INFLUÊNCIA DA DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E DOS ASPECTOS FENOLÓGICOS DE *Tithonia diversifolia* HEMSL. A. GRAY (ASTERACEAE) NA SUA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA / Ana Carolini Cavallieri Zatta Zatta. - 2026.
(recurso não paginado). : il.

Orientadora: Maria do Carmo Pimentel Batitucci.
Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e Naturais.

1. Produtos Naturais. 2. Metabólitos Secundários. 3. Atividade antiproliferativa. 4. Câncer. I. Batitucci, Maria do Carmo Pimentel. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Humanas e Naturais. III. Título.

CDU: 57

Ana Carolini Cavallieri Zatta


**INFLUÊNCIA DA DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E DOS ASPECTOS
FENOLÓGICOS DE *Tithonia diversifolia* HEMSL. A. GRAY
(ASTERACEAE) NA SUA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE
BIOLÓGICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais, da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Biologia Vegetal.


Aprovada em 12 de fevereiro de 2026.

Comissão Examinadora:

Profª Drª Maria do Carmo Pimentel Batitucci (UFES)
Orientadora e Presidente da Comissão

Documento assinado digitalmente
 HILDEGARDO SEIBERT FRANCA
Data: 16/02/2026 20:17:38-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Hildegardo França (UFES)
Examinador Interno

Documento assinado digitalmente
 IARA DA COSTA SOUZA
Data: 16/02/2026 10:15:14-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profª. Drª. Iara da Costa Souza (UFSCAR)
Examinadora Externa



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
MARIA DO CARMO PIMENTEL BATITUCCI - SIAPE 1172766
Departamento de Ciências Biológicas - DCB/CCHN
Em 19/02/2026 às 08:38

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link: <https://api-lepisma.prod.uks.ufes.br/arquivos-assinados/1283718?tipoArquivo=O>

DEDICATÓRIA

Agradeço a todos do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal (PPGBV) pelo suporte institucional e pela contribuição para minha formação acadêmica ao longo desses dois anos.

Aos professores do programa, pela dedicação, pelos ensinamentos e pelo incentivo constante, e aos amigos que fiz durante a pós-graduação, pelo companheirismo, trocas de experiências e apoio ao longo dessa trajetória.

Agradeço, também, ao Laboratório Multiusuário de Instrumentação (LabMIsnt) e ao Centro de Espectrometria de Massas de Biomoléculas (CEMBIO), no Rio de Janeiro e ao do Herbário VIES (UFES – Vitória).

Sou grata à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento que possibilitou o desenvolvimento desta pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho, primeiramente, a Deus, por me conceder força, sabedoria e perseverança ao longo de toda esta caminhada.

À minha família, pelo amor, apoio constante e compreensão nos momentos de ausência, sendo meu alicerce em todas as etapas da vida acadêmica.

Aos meus amigos de dentro da UFES e fora da UFES que me ajudam com as rotinas de laboratórios, contas que não faziam sentido na minha cabeça, pela escuta, pelo carinho e pelo apoio nos momentos em que mais precisei, tornando essa jornada mais leve e possível.

Em especial aos amigos do laboratório, a Lani, Isa, Paulete, Miri, Gabi e o Evan por compartilhar comigo todas as vivências de laboratório, cuidar de células, ajudar nos ensaios, baixar programas e analisar a estatística.

Aos meus amigos da vida, o Álvaro que sempre estava pronto para editar uma imagem. Ao meu amigo Daniel que no final das contas a gente já não sabia qual célula era minha e qual era dele. E por fim, ao meu amigo Enzo que me recebeu em Curitiba e fez eu abrir a minha cabeça e sempre confiar no meu potencial.

Ao meu companheiro que mesmo não entendendo os conteúdos biológicos sempre esteve ao meu lado, mesmo apenas escutando ou até mesmo formatando alguma parte da minha dissertação com toda calma e paciência do mundo.

Aos meus pais que sempre me incentivaram a estudar, por todas as vezes que minha mãe levou cafezinho pra mim enquanto eu estudava e ao meu pai que consertou o meu cabo de *notebook* diversas vezes para eu conseguir finalizar as análises no computador antigo.

Aos meus professores em especial a professora Maria do Carmo Pimentel Batitucci que contribuiu para a minha formação e para a concretização deste trabalho.

RESUMO

Tithonia diversifolia Hemsl. A. Gray, popularmente conhecida como girassol mexicano, é uma espécie da família Asteraceae reconhecida pelo seu potencial farmacológico, incluindo atividades antioxidante, anti-inflamatória e antiproliferativa. A variabilidade da composição química de espécies vegetais pode ser influenciada por fatores ambientais e fenológicos, impactando diretamente na sua bioatividade. O presente estudo teve como objetivo analisar e correlacionar a composição química e a atividade antiproliferativa de extratos hidroalcoólicos de folhas de *Tithonia diversifolia* provenientes de cinco localidades do Espírito Santo (Colatina, Muniz Freire, Viana, UFES-Vitória e Santa Teresa), coletadas nos estádios vegetativo (2014) e reprodutivo (2015). Além disso, para avaliar a estabilidade temporal, uma nova coleta foi realizada após 10 anos (2024) nas localidades da UFES e Santa Teresa. A caracterização química dos extratos foi realizada por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), Espectrometria de Massas por Ionização por Eletrospray (ESI-TOF) e análises quimiométricas (Análise de Componentes Principais - PCA e Análise de Agrupamento Hierárquico - HCA). Os resultados evidenciaram um perfil químico diversificado, com a anotação de metabólitos secundários de interesse, tais como ácidos hidroxicinâmicos (ex.: ácido cafeoilquínico), flavonoides (ex.: apigenina, naringenina), lactonas sesquiterpênicas (ex.: tagitinina A) e ácidos graxos. A análise multivariada revelou um agrupamento das amostras com base na origem geográfica, destacando-se as amostras de Santa Teresa por apresentarem um perfil químico distinto e maior variabilidade temporal. A atividade biológica foi avaliada por meio de ensaios *in vitro* utilizando as linhagens celulares MCF-7 (carcinoma de mama) e MCF-10A (epitélio mamário não tumoral). Os ensaios de viabilidade celular (MTT) demonstraram que os extratos possuem atividade antiproliferativa concentração-dependente contra células MCF-7. Os extratos MUF4 e MUF5, provenientes de Muniz Freire, apresentaram os maiores Índices de Seletividade (IS > 2,0), indicando ação preferencial sobre as células tumorais. Enquanto os ensaios de proliferação (cristal violeta) e clonogenicidade corroboraram com a inibição do crescimento e da capacidade de formação de colônias pelas células MCF-7 tratadas com esses extratos. A investigação dos mecanismos de ação revelou que MUF4 e MUF5 induziram um aumento significativo na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), causaram parada do ciclo celular, predominantemente nas fases S e G2/M, e ativaram a apoptose, conforme confirmado pelo ensaio de Anexina V/PI. Não foi observada,

contudo, indução significativa de fosforilação da histona H2AX (γ -H2AX), um marcador de danos de dupla fita no DNA, sugerindo que a citotoxicidade não é mediada por genotoxicidade direta, mas sim por desequilíbrio redox e estresse celular. Conclui-se que a composição química e a atividade antiproliferativa de *Tithonia diversifolia* variam conforme a localidade geográfica e o estágio fenológico da planta. Os extratos de Muniz Freire destacaram-se por sua atividade seletiva contra células de câncer de mama, atuando por meio da indução de estresse oxidativo, modificações no ciclo celular e ativação da apoptose. Os resultados reforçam o potencial terapêutico da espécie e destacam a importância de se considerar a origem botânica e as condições de cultivo no desenvolvimento de fitoterápicos.

Palavras-chave: Câncer • Metabólitos secundários • Citometria de fluxo • FTIR • Espectrometria de massas.

ABSTRACT

Tithonia diversifolia Hemsl. A. Gray, popularly known as Mexican sunflower, is a species of the Asteraceae family with recognized pharmacological potential, including antioxidant, anti-inflammatory, and antiproliferative activities. The variability of the chemical composition of plant species can be influenced by environmental and phenological factors, directly impacting their bioactivity. This study aimed to analyze and correlate the chemical composition and antiproliferative activity of hydroalcoholic leaf extracts of *Tithonia diversifolia* from five locations in Espírito Santo (Colatina, Muniz Freire, Viana, UFES-Vitória, and Santa Teresa), collected at vegetative (2014) and reproductive (2015) stages. Furthermore, to assess temporal stability, a new collection was performed after 10 years (2024) at the UFES and Santa Teresa locations. Chemical characterization of the extracts was performed using Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), high-resolution Electrospray Ionization Mass Spectrometry (ESI-TOF), and chemometric analyses (Principal Component Analysis - PCA and Hierarchical Cluster Analysis - HCA). The results revealed a diversified chemical profile, with the annotation of secondary metabolites of interest, such as hydroxycinnamic acids (e.g., caffeoylquinic acid), flavonoids (e.g., apigenin, naringenin), sesquiterpene lactones (e.g., tagitinin A), and fatty acids. Multivariate analysis revealed a clustering of samples based on geographical origin, with samples from Santa Teresa standing out for presenting a distinct chemical profile and greater temporal variability. Biological activity was evaluated through *in vitro* assays using the MCF-7 (breast carcinoma) and MCF-10A (non-tumor mammary epithelium) cell lines. Cell viability assays (MTT) demonstrated that the extracts have concentration-dependent antiproliferative activity against MCF-7 cells. The MUF4 and MUF5 extracts, from Muniz Freire, showed the highest Selectivity Indices ($SI > 2.0$), indicating preferential action against tumor cells. Meanwhile, the proliferation assay (crystal violet) and clonogenicity assays corroborated the inhibition of growth and colony-forming capacity of MCF-7 cells treated with these extracts. Investigation of the mechanisms of action revealed that MUF4 and MUF5 induced a significant increase in the production of reactive oxygen species (ROS), caused cell cycle arrest, predominantly in the S and G2/M phases, and activated apoptosis, as confirmed by the Annexin V/PI assay. However, no significant induction of histone H2AX phosphorylation (γ -H2AX), a marker of double-strand DNA breaks, was observed, suggesting that cytotoxicity is not mediated by direct genotoxicity, but rather by redox

imbalance and cellular stress. It is concluded that the chemical composition and antiproliferative activity of *Tithonia diversifolia* vary according to the geographical location and phenological stage of the plant. The extracts from Muniz Freire stood out for their selective and potent activity against breast cancer cells, acting through the induction of oxidative stress, disruption of the cell cycle, and activation of apoptosis. The results reinforce the therapeutic potential of the species and highlight the importance of considering botanical origin and growing conditions in the development of phytomedicines.

Keywords: Cancer • Secondary Metabolite • Flow Cytometry • FTIR • Mass Spectrometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Aspectos gerais da <i>Tithonia diversifolia</i> , evidenciando suas folhas, flores e caules.	20
Figura 2: Mapa de dispersão de <i>Tithonia diversifolia</i>	20
Figura 3: Distribuição densa de <i>Tithonia diversifolia</i> em áreas invadidas.	21
Figura 4: Fluxograma das três etapas operacionais de um espectrômetro de massas: (1) Ionização, (2) Separação por m/z e (3) Detecção.	27
Figura 5: Esquema da fosforilação da histona H2AX.	35
Figura 6: Espectros de FTIR de extratos hidroalcoólicos de folhas de <i>Tithonia diversifolia</i> provenientes de cinco localidades do Espírito Santo 2014 e 2015.....	55
Figura 7: Espectros de FTIR de extratos hidroalcoólicos de folhas de <i>Tithonia diversifolia</i> provenientes de UFES e Santa Teresa.....	58
Figura 8: Análise de Agrupamento Hierárquico (HCA) dos extratos de folhas de <i>Tithonia diversifolia</i> provenientes de diferentes localidades e anos de coleta.....	60
Figura 9: Análise de Componentes Principais (PCA) dos extratos de folhas de <i>Tithonia diversifolia</i> provenientes de diferentes localidades e anos de coleta.....	62
Figura 10: Gráficos de viabilidade celular obtidos após 48 horas de exposição ao extrato hidroalcoólico de <i>Tithonia diversifolia</i> em diferentes concentrações, avaliando-se as linhagens MCF-7 e MCF-10A, para as coletas realizadas nos anos de 2014 e 2015.....	83
Figura 11: Gráficos de viabilidade celular obtidos após 72 horas de exposição ao extrato hidroalcoólico de <i>Tithonia diversifolia</i> em diferentes concentrações, avaliando-se as linhagens MCF-7 e MCF-10A, para as coletas realizadas nos anos de 2014 e 2015.....	85
Figura 12: Gráficos de viabilidade celular obtidos após 48 e 72 horas de exposição ao extrato hidroalcoólico de <i>Tithonia diversifolia</i> em diferentes concentrações, avaliando-se as linhagens MCF-7 e MCF-10A, para as coletas realizadas nos anos de 2024.....	86
Figura 13: Efeito dos extratos MUF4 e MUF5 sobre a proliferação de células MCF-7 no ensaio de cristal violeta após 24 h de tratamento. Os valores representam a média \pm DP de três experimentos independentes. O asterisco indica diferença estatisticamente significativa.....	91
Figura 14: Avaliação do potencial clonogênico de células MCF-7 cultivadas em DMEM e RPMI após tratamento com os extratos de MUF4 e MUF5.....	92

Figura 15: Número de colônias formadas pela linhagem MCF-7 após os tratamentos nos meios DMEM e RPMI. Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão. CN: controle negativo; MUF4 e MUF5: tratamentos testados. * $p < 0,05$ em relação ao controle. 2093

Figura 16: Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em células MCF-7 tratadas com os extratos de *Tithonia diversifolia* (MUF4; MUF5) por 24h e 48h. Os resultados estão expressos como intensidade média de fluorescência (MFI).. Dados expressos como média \pm DP..... 94

Figura 17: Distribuição do ciclo celular de células MCF-7 após tratamento com os extratos de *Tithonia diversifolia* (MUF4 e MUF5) por 24h e 48h, analisada por citometria de fluxo..... 95

Figura 18: Intensidade média de fluorescência (MFI) da fosforilação da histona H2A.X em células MCF-7 expostas aos compostos MUF4 e MUF5 por 4h e 24h. Os valores representam média \pm DP de três experimentos independentes..... 97

Figura 19: Análise da morte celular e apoptose em células MCF-7 pelo ensaio de Anexina V/PI. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão. O símbolo * indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo ($p < 0,05$).....100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação dos metabólitos secundários vegetais de acordo com suas principais classes químicas, com exemplos de moléculas e respectivas estruturas químicas.	18
Tabela 2: Principais compostos bioativos isolados de <i>Tithonia diversifolia</i> e as atividades farmacológicas investigadas em estudos reportados na literatura.....	23
Tabela 3: Bandas de FTIR e grupos funcionais correspondentes identificados nas amostras de <i>Tithonia diversifolia</i>	56
Tabela 4: Compostos detectados por análise de espectrometria de massas com ionização por Eletrospray ESI-TOF. DBE = Índice de deficiência de hidrogênio (Double bound equivalent). O sinal + indica a presença do composto e – indica ausência.....	65
Tabela 5: Principais classes químicas e compostos anotados em <i>Tithonia diversifolia</i>	67
Tabela 6: Valores de IC ₅₀ (µg/mL) determinados pelo ensaio de MTT em células MCF-10A (normais) e MCF-7 (câncer de mama) após 48h de exposição aos extratos, e respectivos Índices de Seletividade (IS). Foram considerados seletivos os extratos com IS > 2,0.....	88
Tabela 7: Valores de IC ₅₀ (µg/mL) determinados pelo ensaio de MTT em células MCF-10A (normais) e MCF-7 (câncer de mama) após 72 h de exposição aos extratos, e respectivos Índices de Seletividade (IS). Foram considerados seletivos os extratos com IS > 2,0.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS

COL - Colatina

DMSO- Dimetilsulfóxido

EROs- Espécies reativas de Oxigênio

ESI-TOF- Ionização por Eletrospray – Tempo de Voo (Electrospray Ionization – Time of Flight)

FTIR – Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

HCA – Análise por Agrupamentos Hierárquicos (Hierarchical Cluster Analysis)

IC₅₀ – Concentração inibitória média necessária para atingir 50% do efeito

IS- Índice de seletividade

MCF-7 - Michigan Cancer Foundation-7

MCF-10A- Michigan Cancer Foundation-10 A

MSVs- Metabólitos secundários vegetais

MTT - (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-brometo de difeniltetrazólio)

MUF- Muniz Freire

MMPs- Metaloproteinases de matriz

OMS- Organização Mundial da Saúde

PCA – Análise de Componentes principais

PS- Fosfatidilserina

SANT- Santa Teresa

SLs- Lactonas sesquiterpênicas

UFES- Ufes

VIA- Viana

UFC- Unidade Formadora de Colônias

USD/ha- Dólar por hectare

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	14
2. OBJETIVO GERAL	15
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
4.1 Plantas medicinais como fontes de compostos bioativos	16
4.2 Metabólitos secundários vegetais	17
4.3 <i>Tithonia diversifolia</i> HEMSL. A. GRAY	19
4.3.1 <i>Classificação botânica e distribuição geográfica</i>	19
4.3.2 <i>Importância econômica</i>	21
4.3.3 <i>Atividades farmacológicas e relação com o câncer</i>	23
4.4 Análises químicas em produtos naturais	25
4.4.1 <i>Espectroscopia do infravermelho com Transformada de Fourier</i>	26
4.4.2 <i>Espectrometria de Massas por Ionização por Eletrospray (ESI-TOF)</i>	27
4.5 Atividade antiproliferativa	28
4.5.1 <i>Ensaio MTT</i>	30
4.5.2 <i>Proliferação celular com Cristal Violeta</i>	32
4.5.3 <i>Ensaio clonogênico</i>	32
4.5.4 <i>Ciclo celular e Espécies Reativas de Oxigênio- EROs</i>	32
4.5.5 <i>Fosforilação da histona H2AX</i>	34
4.5.6 <i>Anexina V</i>	38
5- REFERÊNCIAS	39
CAPÍTULO 1 – Modulação geográfica do perfil fitoquímico de <i>Tithonia diversifolia</i> (Hemsl.) A. Gray	51
RESUMO	51
ABSTRACT	523
1. INTRODUÇÃO	54
2. MATERIAIS E MÉTODOS	55
2.1. <i>Obtenção dos extratos</i>	55
2.2. <i>Espectroscopia no Infravermelho</i>	55
2.4. <i>Espectrometria de Massas por Ionização por Eletrospray (ESI-TOF)</i>	56
2.5 <i>Análise estatística</i>	56
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
3.1 <i>Espectroscopia no Infravermelho- FTIR</i>	56
3. 2 <i>Análise Multivariada</i>	62
3.3 <i>Análise de ESI-TOF</i>	65
4. CONCLUSÕES	70
4. REFERÊNCIAS	72
CAPÍTULO 2 – Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antiproliferativa de extratos de <i>Tithonia diversifolia</i> (Hemsl.) A. Gray	76

RESUMO	76
ABSTRACT	78
1. INTRODUÇÃO	79
2. MATERIAIS E MÉTODOS	80
2.1 <i>Obtenção dos extratos</i>	80
2.2 <i>Viabilidade celular</i>	80
2.3 <i>Proliferação celular</i>	81
2.4 <i>Ensaio clonogênico</i>	81
2.5 <i>Ciclo celular e Espécies reativas de oxigênio (EROs)</i>	82
2.6 <i>Ensaio de Fosforilação da Histona H2A.X</i>	82
2.7 <i>Anexina</i>	83
2.8 <i>Análise Estatística</i>	84
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	84
3.1 <i>Viabilidade celular</i>	84
3.2 <i>Proliferação celular</i>	92
3.3 <i>Ensaio clonogênico</i>	93
3.4 <i>Ciclo celular e EROs</i>	95
3.5 <i>Ensaio de Fosforilação da Histona H2A.X</i>	99
3.6 <i>Anexina</i>	101
5. CONCLUSÕES	102
5. REFERÊNCIAS	103

1. INTRODUÇÃO GERAL

Tithonia diversifolia (Hemsl.) A. Gray, popularmente conhecida como girassol mexicano, calêndula ou girassol selvagem, é um arbusto herbáceo, perene, pertencente à família Asteraceae, nativo do México e da América Central (Giacomo *et al.*, 2015; Kato-Noguchi, 2020). A espécie se destaca por sua facilidade de adaptação e potencial invasivo, tendo se naturalizado em mais de 70 países em regiões tropicais, subtropicais e temperadas quentes da Austrália, América do Sul, África, Sudeste Asiático e ilhas do Pacífico (Kato-Noguchi, 2020; Obiakara *et al.*, 2018; Kato-Noguchi *et al.*, 2025).

Dada a sua ampla distribuição, a espécie possui uma alta variação genética e a capacidade de se adaptar em condições ambientais diversas, incluindo precipitação anual de 700 a 2500 mm, temperaturas de 12 a 38 °C e solos com pH entre 6,1 e 7,8 (Kato-Noguchi *et al.*, 2025). Dessa maneira, o estudo de Rolnik e Olas (2021) revelou que a família Asteraceae, é reconhecida por ser uma rica fonte de metabólitos secundários, como lactonas sesquiterpênicas, flavonoides e polifenóis, além de apresentar diversas atividades biológicas, incluindo ações antiproliferativas contra linhagens celulares cancerígenas (Anantharaju *et al.*, 2016).

A partir disso, a composição química desempenha um papel importante na modulação da atividade biológica de extratos vegetais, que são fenômenos dinâmicos, influenciados por fatores intrínsecos e extrínsecos. Diante desse cenário, e da busca por novos agentes terapêuticos, a bioprospecção de espécies vegetais emerge como uma estratégia fundamental, especialmente no contexto da fitoquímica de produtos naturais. Sendo assim, investigações que abordam a estrutura química dos compostos bioativos, distribuição entre diferentes espécies vegetais, bem como sua função biológica e avaliação farmacológica, constituem caminhos iniciais para o desenvolvimento de novos fitoterápicos e medicamentos destinados ao tratamento de diversas enfermidades (MENDOZA; SILVA, 2018).

Portanto, compreender essas correlações é fundamental tanto para a farmacognosia quanto para o desenvolvimento de futuros fitomedicamentos. Ademais, esse conhecimento pode promover avanços significativos na área de produtos naturais, ao contribuir para a elucidação de características biológicas e fitoquímicas em *T. diversifolia*. Além de aumentar o interesse científico pela espécie e fomentar descobertas com potencial terapêutico no combate a diversas enfermidades.

2. OBJETIVO GERAL

Analisar e correlacionar a composição química e com as atividades biológicas de extratos hidroalcoólicos de folhas de *Tithonia diversifolia* provenientes de cinco diferentes localidades do Espírito Santo nos estádios vegetativo e reprodutivo.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar o perfil químico de extratos de *Tithonia diversifolia*, provenientes de cinco localidades do Espírito Santo nos estádios vegetativo e reprodutivo, por meio de Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e Espectrometria de Massas, correlacionando com as variáveis fenológicas e geográficas.

Avaliar a atividade antiproliferativa e a citotoxicidade seletiva dos extratos nas linhagens celulares MCF-7 (cancerosa) e MCF-10A (não cancerosa) por meio dos ensaios de MTT e cristal de violeta.

Avaliar o efeito proliferativo dos extratos hidroalcoólicos seletivos por meio do ensaio clonogênico das células MCF-7, a fim de investigar o impacto dos tratamentos na sobrevivência e no potencial proliferativo das células tumorais.

Investigar a indução de apoptose nos tratamentos com os extratos seletivos por meio do ensaio de dupla marcação com Anexina V e Iodeto de Propídio, analisado por citometria de fluxo.

Quantificar a geração de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) intracelulares após os tratamentos, por meio de citometria de fluxo, para avaliar a contribuição do estresse oxidativo nos mecanismos de citotoxicidade.

Analisar a distribuição do ciclo celular da linhagem MCF-7 após exposição aos extratos, através da citometria de fluxo, para identificar e relacionar com as fases específicas do ciclo.

Verificar a indução de danos no DNA por meio da detecção da fosforilação da histona H2AX(γ -H2AX) nos tratamentos com os extratos.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 *Plantas medicinais como fontes de compostos bioativos*

As plantas medicinais há muito tempo têm sido reconhecidas como fontes importantes de compostos terapeuticamente ativos (Dar *et al.*, 2023). Dessa forma, de acordo com Daniel *et al.* (2020) planta medicinal é definida como qualquer planta na qual um ou mais de seus órgãos contêm substâncias que podem ser usadas para a síntese de medicamentos úteis, servindo também como importantes precursores para o design de medicamentos modernos. A partir disso, um estudo elaborado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), mais de 80% da população mundial depende da medicina tradicional para seus cuidados primários de saúde (Rajcevic *et al.*, 2022).

A partir disso, os compostos bioativos presentes nas plantas medicinais são derivados principalmente de metabólitos secundários, incluindo compostos fenólicos (curcuminas, flavonoides e taninos), saponinas, terpenoides e alcaloides (Adebayo *et al.*, 2015). Estes fitoconstituintes possuem diversas ações já descritas na literatura como antioxidante, antisséptico, antimicrobiano, anti-inflamatório, antiviral, citotóxico, neuroprotetor, dentre outros benefícios (Rajcevic *et al.*, 2022).

De acordo com dados da Food and Drug Administration (FDA), mais da metade dos medicamentos aprovados, contêm compostos naturais ou seus derivados (Taher *et al.*, 2025). Contudo, a importância das plantas medicinais como fontes de compostos bioativos é evidenciada diante dos compostos como esteroides, fenólicos, flavonoides, glicosídeos e outros fitoconstituintes, sendo considerados relativamente mais seguros em comparação às moléculas de medicamentos sintéticos (Mahnashi *et al.*, 2022).

A ampla diversidade de espécies vegetais presente na natureza representa uma importante fonte desses compostos, na qual historicamente, desempenharam papel fundamental na farmacoterapia e continuam contribuindo para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (Sanjai *et al.*, 2024). Com aproximadamente 500.000 espécies vegetais ocorrendo mundialmente, das quais apenas 1% foi investigada fitoquimicamente, sendo assim existe um grande potencial para descobrir novos compostos bioativos (Monisha *et al.*, 2017). Este potencial inexplorado, combinado com a crescente resistência a medicamentos convencionais e agentes sintéticos, torna as plantas medicinais uma alternativa promissora para enfrentar os desafios globais de saúde, além de apresentar uma alternativa mais

acessível em países cuja população enfrenta uma dificuldade de acesso aos medicamentos sintéticos (Afzal *et al.*, 2025).

Muitos fitoterápicos, são utilizados com segurança, com seus registros baseados em evidências científicas, seguindo parâmetros regulatórios específicos dos países nos quais são produzidos. No entanto, permanecem desafios importantes, como a padronização de extratos, a otimização da biodisponibilidade, a validação e a segurança em ensaios pré-clínicos e clínicos, etapas essenciais para a transição do conhecimento tradicional para aplicações farmacêuticas modernas (Atanasov *et al.*, 2021). Esses aspectos são relevantes para o uso de medicamentos à base de plantas medicinais, considerando o expressivo interesse da população por esses produtos e o elevado potencial da biodiversidade brasileira para sua produção (Dutra *et al.*, 2016).

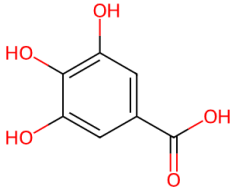
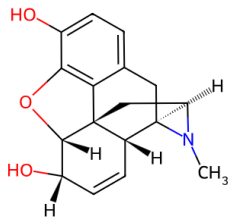
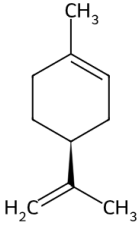
4.2 Metabólitos secundários vegetais

Os metabólitos secundários vegetais (MSVs) são compostos orgânicos produzidos pelas plantas que se distinguem fundamentalmente dos metabólitos primários por não serem diretamente envolvidos em processos essenciais como fotossíntese, respiração, síntese de proteínas ou formação de carboidratos, proteínas e lipídios. Diferentemente dos metabólitos primários como clorofila, aminoácidos, nucleotídeos e carboidratos simples, os metabólitos secundários constituem um grupo grande e variado de compostos orgânicos sintetizados em pequenas quantidades (Mera *et al.*, 2019; Korankye *et al.*, 2017).

Ao analisar a bioquímica dos metabólitos secundários, eles derivam de precursores do metabolismo primário, onde a estrutura molecular do precursor é modificada através da ação sucessiva de enzimas especializadas (Jacoby *et al.*, 2021). Estas vias metabólicas secundárias são definidas como processos não-essenciais para a sobrevivência, crescimento e reprodução do organismo, mas que produzem uma diversidade de compostos com funções especializadas (Yang *et al.*, 2018).

Os MSVs são classificados em três grupos, assim como evidenciado na tabela 1 de acordo com sua estrutura química: compostos fenólicos (substâncias aromáticas), compostos nitrogenados (alcaloides) e terpenóides (Pang *et al.*, 2021). Alguns autores também incluem saponinas e glicosídeos como categorias adicionais (Alum *et al.*, 2025).

Tabela 1: Classificação dos metabólitos secundários vegetais de acordo com suas principais classes químicas, com exemplos de moléculas e respectivas estruturas químicas. Fonte: Adaptado de Mera *et al.* (2019).

Classes	Exemplos de compostos	Características principais	Estrutura molecular
Compostos fenólicos	Ácido gálico Ácido caféico Ácido ferúlico Quercetina Kaempferol Taninos	Apresentam ao menos um anel aromático ligado a um ou mais grupos hidroxila	 <p>Ácido gálico</p>
Compostos nitrogenados (alcaloides)	Morfina Cafeína Nicotina Quinina Atropina	Contêm um ou mais átomos de nitrogênio em sua estrutura	 <p>Morfina</p>
Terpenoides (isoprenoides)	Limoneno Mentol β -cariofileno Taxol Carotenoides	Constituídos por unidades de isopreno (C_5H_8), organizadas em mono-, sesqui-, di-, tri- e tetraterpenos	 <p>Limoneno</p>

Essa classificação baseia-se predominantemente na estrutura química dos metabólitos, a qual está diretamente relacionada às suas propriedades biológicas e farmacológicas. Embora inicialmente os MSVs aparentemente não ter função direta no crescimento e desenvolvimento das plantas, estudos mais recentes revelaram que os metabólitos secundários desempenham papéis cruciais na proteção contra herbívoros, infecções por

patógenos microbianos, danos mecânicos e adaptação a mudanças ambientais súbitas como temperatura, umidade e seca (Korankye *et al.*, 2017; Mera *et al.*, 2019; Pang *et al.*, 2021).

Dessa maneira, os MSVs estão distribuídos por diversas partes da planta, com moléculas biologicamente ativas encontradas nas folhas, raízes e caules (Merciline *et al.*, 2020). Esses compostos incluem alcaloides, antocianidinas, flavonoides, saponinas, esteroides, taninos e terpenoides (Okiti *et al.*, 2020).

As lactonas sesquiterpênicas representam uma das classes químicas mais importantes encontradas em *T. diversifolia*, com oito compostos diferentes identificados em extratos foliares (Morais Neto *et al.*, 2019). Entre as lactonas sesquiterpênicas notáveis, incluem-se 1 β ,2 α -epoxitagitinina C, tagitinina F, tagitinina A, tagitinina C, guaianolida 7, éter 3-O-metílico da tirotundina e tirotundina (Matos *et al.*, 2021). Estudos recentes de isolamento guiado por bioatividade identificaram compostos adicionais, incluindo desacetilviguistenina, ácido 4-O-cafeoil-2-metiloxirano-2-carboxílico e sandaracopimaradieno-1 α ,9 α -diol, em folhas da espécie (Kerebba *et al.*, 2022).

4.3 *Tithonia diversifolia* HEMSL. A. GRAY

4.3.1 Classificação botânica e distribuição geográfica

Tithonia diversifolia (Hemsl.) A. Gray é uma planta herbácea popularmente conhecida por vários nomes, incluindo girassol mexicano, calêndula e crisântemo Nitobe (Kato-Noguchi, 2020). Do ponto de vista taxonômico, a espécie é classificada no filo Spermatophyta, classe Dicotyledoneae, ordem Asterales, família Asteraceae e gênero *Tithonia* (Kato-Noguchi *et al.*, 2025).

Segundo Kato-Noguchi e colaboradores (2025), a *T. diversifolia* é uma planta herbácea perene, semelhante a um arbusto, que tipicamente cresce de 2 a 5 metros de altura, embora possa atingir alturas de até 6 metros em condições ótimas. Em alguns casos ela cresce isoladamente e a planta pode atingir até 10 metros de altura (Obiakara *et al.*, 2018). De acordo com o mesmo trabalho citado anteriormente, a espécie demonstra plasticidade morfológica, ocorrendo como agrupamentos herbáceos ou hábito arbustivo.

Os caules são caracteristicamente verdes e pilosos quando jovens, tornando-se marrons e lenhosos com a maturidade e ramificados, assim como demonstrado na figura 1. A planta possui um caule medular que geralmente não é ramificado e apresenta alta densidade de 8 a 20 plantas por metro quadrado. Como erva lenhosa tropical ou arbusto suculento, a espécie pode suportar condições de calor e seca (Mercilene *et al.*, 2020). A planta tem raízes superficiais e tipicamente forma agrupamentos impenetráveis em habitats adequados (Obiakara *et al.*, 2018).



Figura 1: Aspectos gerais da *Tithonia diversifolia*, evidenciando suas folhas, flores e caules. Fonte: Kato-Noguchi *et al.*, (2025).

As folhas são grandes, alternadas e subovais, com 3 a 5 lóbulos, medindo de 10 a 40 cm de comprimento e de 4 a 12 cm de largura, embora possam atingir até 45 cm de comprimento. As folhas são presas aos caules por pecíolos de 5 a 15 cm de comprimento (Obiakara *et al.*, 2018; Kato-Noguchi *et al.*, 2025). A sua capacidade de produzir flores e sementes ao longo do ano, está aliada à eficiente dispersão de sementes pelo vento, água e animais, possibilitando a rápida colonização de novas áreas (Okiti *et al.*, 2020).

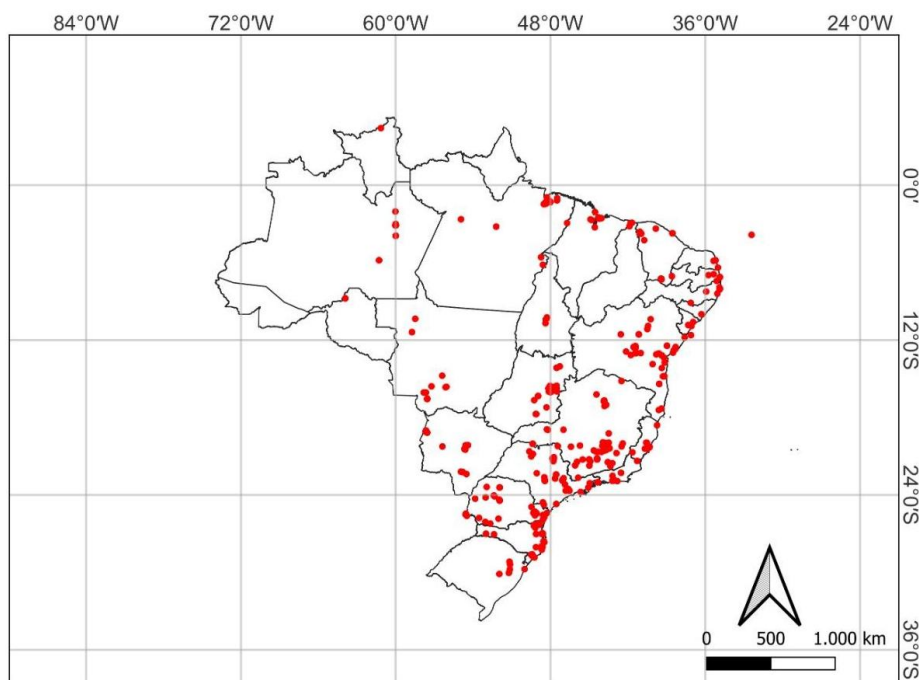


Figura 2: Mapa de dispersão de *Tithonia diversifolia*. Fonte: SpeciesLink Network.

A espécie é nativa do México e da América Central e foi amplamente distribuída em partes da África, Austrália, Ásia e outros países da América do Norte, assim como na figura 2 (Giacomo *et al.*, 2015). Segundo Kato-Noguchi *et al.* (2025) e Obiakara *et al.* (2018), a espécie foi introduzida em diferentes regiões por diversas vias, incluindo seu uso intencional como planta ornamental e adubo verde, além da dispersão de sementes misturadas a sementes de culturas agrícolas.

Outra informação relevante é que a espécie é reconhecida como uma planta daninha invasora comum em ecossistemas tropicais (Sampaio *et al.*, 2016). Uma das características invasoras mais significativas é a capacidade de formar densos e impenetráveis aglomerados, assim demonstrados na figura 3, que impedem o crescimento de plantas nativas jovens (Okiti *et al.*, 2020; Obiakara *et al.*, 2018). Como espécie pioneira, ela pode produzir numerosas sementes e formar esses densos aglomerados, que suprimem significativamente o crescimento de espécies nativas e representam uma ameaça à biodiversidade (Luo *et al.*, 2016).



Figura 3: Distribuição densa de *Tithonia diversifolia* em áreas invadidas. Fonte: Kato-Noguchi *et al.*, (2025).

4.3.2 Importância econômica

A *Tithonia diversifolia* possui uma ampla aplicabilidade econômica, uma das suas atribuições é poder ser utilizado como fertilizante orgânico devido à sua composição nutricional ser voltada para aproximadamente 3,5% de nitrogênio, 0,37% de fósforo e 4,1% de potássio em base seca (Tlankka *et al.*, 2020). Dessa maneira, a biomassa da planta se decompõe rapidamente após a aplicação no solo, enriquecendo os nutrientes e melhorando as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo (Ewané *et al.*, 2020).

Estudos de campo proposto por Ewané *et al.* (2020), demonstraram melhorias na produtividade de plantações de mandioca tratadas com 6 toneladas por hectare de biomassa da *T. diversifolia* combinada com fertilizantes minerais atingiram rendimentos de 29,58 t/ha para variedades melhoradas e 22,8 t/ha para variedades locais, em comparação com rendimentos de controle de apenas 17,4 t/ha e 11,8 t/ha, respectivamente, representando aumentos de produtividade de 43-48%.

Os benefícios econômicos na agricultura vão além da fertilização, incluindo aplicações no manejo de pragas, uma vez que a *Tithonia diversifolia* proporciona uma taxa de retorno de 5,32 custo de produção agrícola de dólar por hectare (USD/ha), em comparação com 4,06 USD/ha quando pesticidas sintéticos são utilizados, ao mesmo tempo que fornece nutrientes adicionais por meio da aplicação foliar (Tlankka *et al.*, 2020). A planta demonstrou eficácia em diversas culturas incluindo milho, tomate, couve e feijão-verde, tornando-a particularmente valiosa para pequenos agricultores que não têm condições de adquirir insumos químicos (Mango *et al.*, 2016).

Outra atribuição econômica importante destacada por Mkindi *et al.*, (2015) é a conservação e recuperação do solo em sistemas agrícolas. Essa prática é comumente utilizada para o controle da erosão, estabilização do solo e demarcação de limites, enquanto suas capacidades de fitorremediação permitem que ela acumule metais pesados, como chumbo e zinco, de solos contaminados. Para os agricultores com recursos limitados, a espécie pode representar a principal fonte de matéria orgânica disponível nas fazendas, tornando-se essencial para a manutenção da fertilidade do solo em sistemas de produção sustentáveis (Lunze *et al.*, 2012; Adekiya *et al.*, 2025).

Em síntese, a *Tithonia diversifolia*, representa um importante recurso econômico com diversas aplicações em múltiplos setores, a capacidade da planta de prosperar em solos adversos, combinada com sua rápida taxa de crescimento e alto teor de nutrientes, a posiciona como uma cultura valiosa para o desenvolvimento econômico sustentável em regiões tropicais e subtropicais. Sua importância econômica evidencia a sua versatilidade como fonte de fertilizante orgânico, ração animal, produção de biogás e diversas aplicações industriais, oferecendo oportunidades de geração de renda para comunidades rurais, ao mesmo tempo que contribui para a segurança alimentar e a sustentabilidade ambiental.

4.3.3 Atividades farmacológicas e relação com o câncer

Dentre os diversos usos atribuídos a *Tithonia diversifolia*, destaca-se o uso medicinal, que dentre as aplicações é o mais investigado para a espécie. Esta espécie tem sido tradicionalmente usada na medicina popular para tratar diversas condições, incluindo inflamações, feridas e distúrbios digestivos. A literatura destaca que o estudo pioneiro com organismo *in vitro* ocorreu em 2002 quando extratos da planta foram capazes de induzir diferenciação celular em células HL-60, demonstrando assim propriedades anticancerígenas da *T. diversifolia* com, (Maher *et al.*, 2021).

Nos últimos anos, a pesquisa científica está focada na investigação dos compostos bioativos presentes na espécie e seus potenciais aplicações farmacológicas, especialmente em relação ao tratamento do câncer. De acordo com a tabela 2, a literatura evidencia que os estudos envolvendo a planta concentram-se majoritariamente na investigação de lactonas sesquiterpênicas, especialmente a tagitinina C, a qual apresenta um amplo espectro de atividades biológicas (Kato-Noguchi, 2020).

Tabela 2: Principais compostos bioativos isolados de *Tithonia diversifolia* e as atividades farmacológicas investigadas em estudos reportados na literatura. Fonte: Autoria própria.

Autor/Ano	Composto bioativo	Atividade farmacológica	Principais mecanismos/efeitos
Sánchez-Mendoza <i>et al.</i> , 2011	Tagitinina C	Gastroprotetora	Mecanismo independente de óxido nítrico, prostaglandinas e grupos sulfidríla
Lin <i>et al.</i> , 2022	Tagitinina C	Antitumoral e antimetastática	Indução de apoptose, inibição de MMP-2/MMP-9 e bloqueio do ciclo celular
Kato-Noguchi, 2020	Tagitinina C	Anticancerígena e alelopática	Inibição da germinação e do crescimento vegetal
Tran <i>et al.</i> , 2024	Tagitinina J e K	Citotóxica em células tumorais	Indução de apoptose, bloqueio da fase S e ativação de caspase-3
Ide <i>et al.</i> , 2020	Orizabina	Antiaterosclerótica	Supressão da via Akt via ativação da PTEN
Ngarivhume <i>et al.</i> , 2021	Flavonol	Anti-plasmódica	Mecanismo não elucidado

Além de seu potencial anticancerígeno, a espécie apresenta um amplo espectro de atividades farmacológicas, incluindo ações anti-inflamatórias, antimicrobianas, antimaláricas, antidiabéticas e neuroprotetoras (Rajcevic *et al.*, 2022). Tais efeitos estão associados, em grande parte, aos compostos bioativos presentes em *T. diversifolia* que exercem seus efeitos anticancerígenos através de diversos mecanismos moleculares bem caracterizados.

Um desses compostos é a tagitinina C, descrita por alguns autores com ações distintas, o que demonstra que esse composto ainda está sendo relacionado com alguns efeitos, dentre eles a sua ação antiproliferativa e propriedades antimetastáticas. Além disso, estudos demonstram que o extrato de *T. diversifolia* pode ter capacidade de suprimir a fase G2/M do ciclo celular, reduzindo a viabilidade das células cancerígenas e estimulando a autofagia (Ohiagu *et al.*, 2021). Além dos efeitos já apresentados, a tagitinina C inibe

significativamente a migração celular e reduz a atividade das metaloproteinases de matriz (MMPs), enzimas essenciais para a invasão e metástase tumoral (Lin *et al.*, 2022). Ademais, o mecanismo anticancerígeno da planta é a indução de apoptose, na qual os extratos de acetato de etila das folhas promovem fragmentação do DNA, aumentam a taxa de apoptose e as populações sub-G1 em células de hepatoma HepG2 (Lu *et al.*, 2017). Estudos mais detalhados revelaram que a tagitinina J induz parada do ciclo celular especificamente na fase S, causando mudanças morfológicas, ativação da caspase 3 e aumento da apoptose em estágio inicial em células KB (Tran *et al.*, 2024). Outro mecanismo é a modulação da via Akt/PTEN, onde a orizabina atua como supressor tumoral através da promoção significativa da expressão da proteína PTEN e supressão da fosforilação de Akt (Ide *et al.*, 2020).

Avaliações mais recentes da atividade anticancerígena indicaram que tanto extratos de folhas quanto de caules mostram efeitos citotóxicos contra células de câncer de fígado, cólon, mama e pulmão, mantendo toxicidade mínima para células normais (Ngandjui *et al.*, 2025). Esta seletividade é crucial para o desenvolvimento de agentes terapêuticos seguros e eficazes. Embora haja avanços significativos na compreensão de seus efeitos farmacológicos, os mecanismos moleculares associados à atividade anticancerígena ainda carecem de maior aprofundamento, justificando a realização de novos estudos. Por fim, análises realizadas por Ngarivhume e colaboradores (2021), revelaram que a atividade antimalárica do extrato de folhas de *T. diversifolia* é mediada principalmente pelas lactonas sesquiterpênicas (orizabina e tagitinina C). Dessa forma, os autores sugerem que este novo flavonol, apesar da atividade antimalárica moderada, pode ter potencial para ser testado em outras áreas, como atividade anticancerígena ou antidiabética, dada a conhecida bioatividade dos flavonoides.

4.4 Análises químicas em produtos naturais

No contexto da fitoquímica, os metabólitos secundários assumem papel de importância, uma vez que correspondem a compostos de diferentes formas estruturais e funcionais, geralmente associados aos mecanismos de defesa das plantas, à adaptação ao ambiente e às interações ecológicas (Taiz *et al.*, 2017). Diferentemente dos metabólitos primários, essas substâncias não estão diretamente envolvidas nos processos básicos de crescimento e desenvolvimento vegetal, porém apresentam elevado interesse farmacológico, industrial e biotecnológico,

possibilitando a investigação de como fontes de fármacos, agroquímicos e agentes terapêuticos (Cragg & Newman, 2013).

A análise química desses compostos envolve uma série de etapas metodológicas interdependentes, que incluem desde a preparação do material vegetal até a aplicação de técnicas analíticas avançadas para separação, identificação e quantificação. Entre os procedimentos mais empregados destacam-se os processos de extração sequencial com solventes de polaridades distintas, seguidos por técnicas cromatográficas e espectroscópicas como: cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), espectroscopia no infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas (EM), consideradas fundamentais para a elucidação estrutural de metabólitos bioativos (Mendoza e Silva, 2018).

Além da identificação química, essas abordagens analíticas permitem estabelecer correlações entre a composição química dos extratos vegetais e suas atividades biológicas, contribuindo para a validação científica do uso tradicional de plantas medicinais e para o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos. Nesse sentido, a caracterização fitoquímica representa uma etapa indispensável para assegurar a padronização, reprodutibilidade, segurança de extratos e compostos isolados, especialmente quando se objetiva sua aplicação terapêutica (Simões *et al.*, 2016).

Dessa forma, as análises químicas em produtos naturais configuram-se como ferramentas essenciais no avanço das pesquisas em plantas medicinais, Farmacologia e Biotecnologia, possibilitando não apenas a descoberta de novas moléculas bioativas, mas também o aprofundamento do conhecimento acerca do metabolismo vegetal e de seu potencial como fonte sustentável de substâncias de interesse biológico.

4.4.1 Espectroscopia do infravermelho com Transformada de Fourier

A espectroscopia do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) baseia-se na absorção de radiação infravermelha pelas moléculas, que causa vibrações a partir de características das ligações químicas de cada elemento. A FTIR destaca-se como uma técnica simples, rápida e de baixo custo, gerando resultados precisos (Pavia *et al.*, 2010). Esta técnica opera tipicamente na faixa espectral de 4000 a 700 cm^{-1} , utilizando resolução de 4

cm^{-1} no modo de transmissão, com múltiplas varreduras realizadas sob temperatura controlada (Ricachenevsky *et al.*, 2020).

O processamento dos espectros envolve várias etapas de tratamento de dados, incluindo correções de linha de base, suavização espectral através do algoritmo Savitzky-Golay e normalização (Ricachenevsky *et al.*, 2020). Além disso, as bandas analíticas específicas, como a vibração do estiramento da ligação C-F em 1334 cm^{-1} , podem ser utilizadas para identificação de princípios ativos e estudos de degradação (Ricachenevsky *et al.*, 2020).

Em pesquisas envolvendo produtos naturais e fitoquímicos, a espectroscopia FTIR tem sido cada vez mais empregada para caracterizar compostos bioativos presentes em extratos brutos ou em frações específicas. Na literatura, muitos estudos combinam FTIR com outras técnicas de análise para confirmar a presença de metabólitos de interesse biológico. Por exemplo, Pharmawati & Wrsiati (2020) utilizaram a espectroscopia FTIR para identificar grupos funcionais e compostos como clorofilas e carotenoides no extrato bruto de folhas de *Enhalus acoroides*, dados que foram corroborados por análises complementares de cromatografia em camada fina (TLC), demonstrando a utilidade dessa abordagem integrada na caracterização de pigmentos e outros bioativos em matrizes vegetais marinhas. Nessa perspectiva, a técnica atua como uma ferramenta complementar, contribuindo para a confirmação da presença de compostos bioativos nas amostras e permitindo uma discussão mais precisa e aprofundada sobre o perfil fitoquímico de espécies medicinais.

4.4.2 Espectrometria de Massas por ESI-TOF-

A espectrometria de massa é uma técnica utilizada há mais de um século, com os trabalhos iniciais sobre relações massa/carga realizados por físicos como W. Wien e, de forma pioneira, J.J. Thomson, que em 1913 construiu o primeiro espectrômetro de massa prático (Chandramouleeswaran; Ramkumar, 2014). Essa análise analítica é sensível e versátil usada para possivelmente identificar, quantificar e caracterizar vários tipos de moléculas (Lozeman *et al.*, 2020). A espectrometria de massa emergiu como uma técnica fundamental nas Ciências Biológicas, oferecendo mecanismos para a análise de sistemas biológicos complexos (Wang *et al.*, 2024). A técnica é amplamente utilizada em estudos de proteínas

devido às suas capacidades de análise direcionada, não direcionada e de alto desempenho (Le *et al.*, 2020).

De acordo com Pavia *et al.* (2020), o espectrômetro de massa consiste em três módulos essenciais que funcionam em sequência. O princípio fundamental envolve a conversão de moléculas da amostra em íons gasosos, a separação desses íons de acordo com suas relações massa/carga (m/z) e a medição de suas abundâncias relativas (Ma, 2022). Conforme ilustrado na figura 4, a fonte de íons converte as moléculas da amostra em íons gasosos; o analisador de massa separa esses íons com base em suas razões massa-carga (m/z) utilizando campos eletromagnéticos; e o detector mede a abundância dos íons, convertendo-a em sinais elétricos processáveis por computador. O processo de separação utiliza campos elétricos e/ou magnéticos que atuam diferentemente sobre os íons, dependendo de suas razões m/z .

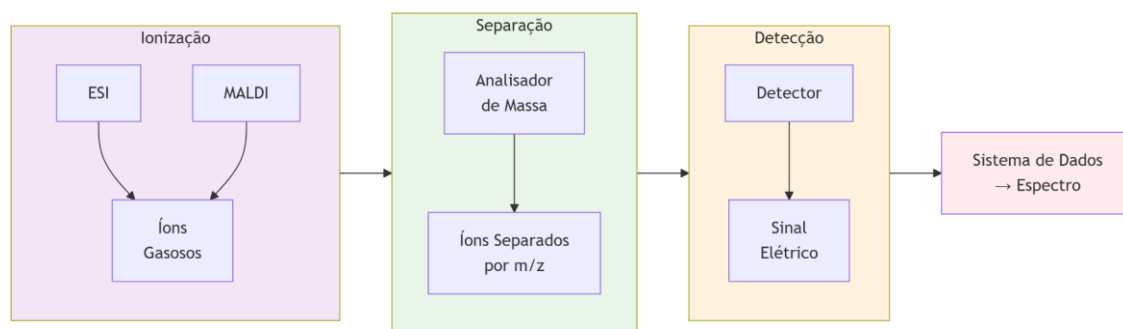


Figura 4: Fluxograma das três etapas operacionais de um espectrômetro de massas: (1) Ionização, (2) Separação por m/z e (3) Detecção. Fonte: Adaptado de Pavia *et al.* (2020).

Dessa forma, a técnica fornece informações estruturais sobre os analitos e pode determinar massas moleculares com alta precisão, dependendo da precisão do analisador de massa (Noriega *et al.*, 2022; Ma, 2022). A técnica tem aplicações tanto qualitativas quanto quantitativas, tornando-a valiosa para a descoberta de novas moléculas, a determinação de quantidades de componentes conhecidos e a elucidação de propriedades estruturais e químicas (Noriega *et al.*, 2022).

A eficiência da análise por espectrometria de massas está diretamente relacionada à escolha da fonte de ionização, uma vez que diferentes técnicas são mais adequadas a determinados tipos de compostos. As fontes podem ser classificadas, de modo geral, em métodos de ionização dura e branda, conforme o grau de fragmentação promovido. A ionização por

impacto de elétrons (EI) é considerada uma técnica de ionização dura, amplamente utilizada para compostos voláteis e termicamente estáveis, especialmente em sistemas de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), promovendo fragmentação intensa e fornecendo informações estruturais detalhadas. Em contraste, métodos de ionização branda, como a ionização por eletrospray (ESI) e a dessorção/ionização a laser assistida por matriz (MALDI), possibilitam a formação do íon molecular com menor fragmentação, sendo particularmente indicados para biomoléculas e compostos de maior massa molecular. A ESI, amplamente empregada em cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS), permite ainda a formação de íons multicarregados, facilitando a análise de macromoléculas.

Além da fonte de ionização, o desempenho analítico depende do tipo de analisador de massa utilizado. Entre os principais destacam-se o quadrupolo, que seleciona íons específicos por meio de campos elétricos oscilantes e é amplamente empregado em análises quantitativas; o analisador por tempo de voo (TOF), que separa os íons com base no tempo necessário para percorrer uma distância fixa após aceleração; as armadilhas iônicas, que possibilitam experimentos de fragmentação sequencial (MS); e analisadores de alta resolução, como o Orbitrap e o FT-ICR, que oferecem elevada exatidão de massa e maior capacidade de elucidação estrutural. A combinação entre diferentes fontes e analisadores possibilita a formação de sistemas híbridos, como Q-TOF e triplo quadrupolo, ampliando as capacidades analíticas, especialmente em experimentos de espectrometria de massas em tandem (MS/MS), fundamentais para a caracterização estrutural de compostos complexos.

Sendo assim, a espectrometria de massa serve como uma ferramenta para pesquisadores da área de ciências da vida que constantemente desenvolvem e aplicam novos métodos para investigar diversas biomoléculas, incluindo proteínas, peptídeos, metabólitos, lipídios e glicanos (Nanni *et al.*, 2022). A capacidade da técnica de fornecer informações de peso molecular altamente precisas a torna útil para a identificação e caracterização de biomoléculas.

4.5 Atividade antiproliferativa

A atividade antiproliferativa representa um dos mecanismos mais importantes na busca por tratamentos eficazes contra doenças caracterizadas pelo crescimento celular descontrolado, especialmente o câncer. Esta propriedade biológica descreve a capacidade de compostos químicos, extratos naturais ou fármacos de inibir ou reduzir significativamente a proliferação celular, interferindo nos processos de divisão e crescimento das células (Picot *et al.*, 2006).

A investigação de substâncias com atividade antiproliferativa abrange desde compostos isolados de plantas medicinais até moléculas sintéticas desenvolvidas especificamente para este fim. Segundo Picot *et al.*, (2006), o estudo desta atividade envolve a compreensão dos mecanismos moleculares que controlam o ciclo celular, os processos de apoptose e as vias de sinalização que regulam o crescimento celular. A avaliação da atividade antiproliferativa utiliza diversos métodos *in vitro* e *in vivo*, permitindo identificar compostos promissores que possam ser desenvolvidos como agentes terapêuticos.

Alguns estudos envolvendo plantas medicinais brasileiras e o fracionamento de extratos vegetais têm revelado compostos altamente ativos que demonstram potencial significativo, como evidenciado pelos extratos de *Baccharis trimera* e *B. articulata*, que causaram redução do índice mitótico e apresentaram efeito antiproliferativo (Fachinetto *et al.*, 2009).

Os mecanismos de ação antiproliferativa envolvem diversos processos moleculares que interferem no crescimento e divisão celular. Um desses mecanismos é a modulação de marcadores de proliferação celular que representa um dos principais mecanismos identificados. Como exemplo a expressão de PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) e Ki-67 são indicadores importantes da atividade proliferativa, sendo que a diminuição da expressão destes marcadores indica redução do processo de proliferação celular (Lopez-Gonzalez, 2024).

De acordo com os autores Borges e colaboradores (2020), Beteto (2015) e Dossena e Marino (2021), outros mecanismos podem ser destacados na ação da proliferação celular, como o controle do ciclo celular, indução de apoptose, atividade antioxidante e a modulação da expressão gênica. Dessa maneira, o referencial aponta que compostos fenólicos podem induzir parada na fase G2/M do ciclo celular sem necessariamente induzir apoptose, além de apresentar a inibição da proliferação de até 30% (Beteto, 2015). Este bloqueio na progressão do ciclo celular permite que as células tenham tempo para reparar danos no DNA ou ativar vias de morte celular programada.

Outra via apontada é a indução de apoptose e modulação da expressão gênica representam mecanismos complementares importantes, na qual atuam pela indução de enzimas metabólicas, modulação da expressão gênica, eliminação de radicais livres e indução de apoptose. O ácido elágico é um composto que demonstra capacidade de atuar preferencialmente sobre células resistentes a quimioterápicos, sugerindo mecanismos de sensibilização celular específicos (Borges *et al.*, 2020).

A imunomodulação, outro mecanismo relevante, possui alguns compostos capazes de induzir linfoproliferação e modular a resposta imune celular (Silva *et al.*, 2021), enquanto outros podem diminuir a capacidade de proliferação das células T frente a estímulos (Alves *et al.*, 2019). Vale destacar, que a atividade antioxidante dos compostos fenólicos pode atuar tanto como mecanismo protetor quanto citotóxico, dessa forma, essas substâncias protegem as células contra processos oxidativos durante a iniciação e progressão do câncer, mas em concentrações elevadas ou na presença de íons metálicos podem atuar como pró-oxidantes, contribuindo para a inibição da proliferação e morte celular (Beteto, 2015).

Os métodos de avaliação da atividade antiproliferativa empregam diversos bioensaios padronizados que permitem determinar a eficácia e seletividade dos compostos testados. Diversos testes são aplicados, dentre eles destacam-se o ensaio de viabilidade celular por MTT, testes em múltiplas linhagens celulares, análise morfológica celular, ensaios de seletividade, citometria de fluxo e ensaios de incorporação de BrdU ou EdU, a partir dos quais é possível determinar valores de IC₅₀. Todos esses ensaios são realizados com o objetivo de elucidar os mecanismos de ação responsáveis pela inibição do crescimento celular e morte das células cancerosas, avaliando processos-chave como a indução de apoptose, parada do ciclo celular, inibição da proliferação e dano ao DNA. A combinação dessas metodologias proporciona um perfil abrangente da atividade antiproliferativa, permitindo distinguir entre efeitos citotóxicos gerais e mecanismos seletivos, o que é fundamental para o desenvolvimento de possíveis fármacos seguros.

4.5.1 Ensaio MTT

Desenvolvido na década de 1980 o ensaio MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo) é um ensaio colorimétrico amplamente utilizado para avaliar a atividade metabólica e viabilidade celular (Girgin *et al.*, 2023). Segundo Suliman *et al.*,

(2022) o ensaio MTT é considerado padrão para ensaios de citotoxicidade, sendo amplamente aplicado em biologia celular e pesquisa de descoberta de medicamentos para avaliar os efeitos citotóxicos de diversos agentes e compostos (Girgin *et al.*, 2023). Além disso, de acordo com os autores já citados, ele é utilizado em larga escala devido a sua rapidez, economia e simplicidade do protocolo, embora apresente algumas limitações como interferência química e instabilidade do sinal.

O princípio fundamental do ensaio baseia-se na capacidade das células vivas de converter o composto MTT amarelo em cristais de formazan de cor roxa através da ação de enzimas oxidoreduases celulares dependentes de NAD(P)H (Olamigoke *et al.*, 2015). Sendo assim, o processo inicia-se com a absorção do MTT pelas células via endocitose, seguida pela redução enzimática intracelular. Após a redução, o MTT é transportado para as superfícies celulares, onde se formam cristais de formazan. Como a redução do MTT ocorre apenas em células metabolicamente ativas, o nível de atividade enzimática serve como medida direta da viabilidade celular (Ahamed *et al.*, 2019).

De acordo com Ahamed e colaboradores (2019) os cristais de formazan insolúveis devem ser solubilizados com DMSO ou outras soluções apropriadas para permitir a quantificação espectrofotométrica. A quantidade de formazan produzida é proporcional ao número de células viáveis presentes, sendo quantificada por espectrofotometria em comprimentos de onda entre 500 e 600 nm, geralmente 570 nm (Girgin *et al.*, 2023).

Contudo, o ensaio apresenta limitações importantes que podem afetar sua confiabilidade, dentre elas estão a interferência química, toxicidade intrínseca do próprio MTT e falta de sensibilidade em certas condições (Suliman *et al.*, 2022). Além disso, problemas técnicos incluem a evaporação de solventes voláteis e a instabilidade do sinal do formazan (Benkhaira *et al.*, 2022). Outra limitação fundamental é sua natureza de ponto final, que permite apenas a detecção de células viáveis em um momento fixo no tempo, dificultando o monitoramento em tempo real da viabilidade celular (Suliman *et al.*, 2022).

4.5.2 Proliferação celular com Cristal Violeta

O cristal violeta (também conhecido como violeta de metila) é um corante básico que tem sido usado em diversas aplicações experimentais como uma ferramenta para avaliar a proliferação celular *in vitro*. Este método baseia-se na capacidade do cristal violeta de se

ligar de forma estável ao DNA e às proteínas nucleares das células aderentes, permitindo uma quantificação direta do número de células presentes em uma cultura conforme descrito por Adan, Kiraz e Baran (2016).

O ensaio de cristal violeta funciona através da fixação das células com formaldeído ou metanol, seguida pela coloração com a solução de cristal violeta e posterior solubilização do corante para leitura espectrofotométrica. Esse teste é frequentemente usado em conjunto com outros métodos de avaliação celular, como o de viabilidade celular (vermelho neutro) e citotoxicidade (MTT) para obter uma visão mais completa da saúde celular (Stroparo *et al.*, 2021).

Em trabalho elaborado por De Almeida *et al.* (2019), que avaliou substâncias antimicrobianas da secreção cutânea de *Phyllomedusa azurea*, o método do cristal violeta foi utilizado para quantificar a formação de biofilme por *S. aureus*. O tratamento com concentrações crescentes da secreção reduziu significativamente a formação de biofilme, sugerindo uma ação antimicrobiana relevante

Vale ressaltar, que a aplicação do ensaio de cristal violeta na avaliação da proliferação celular demonstra versatilidade e confiabilidade em diferentes cenários experimentais, pois apresenta sensibilidade que permite capturar correlações biologicamente significativas, como a inibição da proliferação induzida ou o efeito proliferativo de diferentes tratamentos. Dessa forma, o cristal violeta se estabelece como uma ferramenta fundamental e acessível para a quantificação da proliferação celular em pesquisas científicas, conectando observações *in vitro* a potenciais implicações terapêuticas.

4.5.3 Ensaio clonogênico

O ensaio clonogênico (ou teste de formação de colônias) é um método *in vitro* que avalia a capacidade de sobrevivência e proliferação celular a longo prazo. Segundo Franken e colaboradores (2006), baseia-se no princípio de que uma única célula viável pode se proliferar para formar uma colônia (definida como ≥ 50 células). O teste representa uma técnica que, fundamentalmente, os ensaios clonogênicos padrão medem quantos clonógenos, isto é, células com potencial de autorenovação - sobrevivem a uma determinada dose de tratamento exposto (Puck e Marcus, 1956; Franken *et al.*, 2006). Dessa forma, o ensaio não determina apenas se as células estão vivas após um tratamento,

mas também se elas mantêm sua capacidade funcional de divisão e formação de progênie, o que constitui um indicador de viabilidade celular.

No contexto dos ensaios clonogênicos, estes princípios biológicos fundamentais da clonalidade se manifestam na capacidade de células individuais manterem sua identidade genética e funcional enquanto se dividem para formar colônias. A compreensão destes aspectos mais amplos da clonalidade em sistemas biológicos fornece o contexto necessário para interpretar os resultados obtidos através dos ensaios clonogênicos em laboratório.

4.5.4 Ciclo celular e Espécies Reativas de Oxigênio- EROs

O papel fisiológico das Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) nas plantas foi definido como moléculas sinalizadoras na regulação do desenvolvimento e das respostas adaptativas ao ambiente (Waszczak, Carmody E Kangasjärvi, 2018). Dessa maneira, em concentrações controladas, as EROs atuam como mensageiros redox, modulando uma ampla gama de processos, desde o fechamento estomático e a defesa contra patógenos até a comunicação inter-organelas e a sinalização sistêmica de longa distância.

A partir disso, quando essas moléculas estão em alta concentração, são altamente reativas que se formam naturalmente durante os processos metabólicos celulares (Junior *et al.*, 2015). De acordo com o mesmo autor e colaboradores, estas moléculas podem ter seus níveis significativamente aumentados quando os organismos são expostos a condições de estresse, representando um risco considerável para a integridade celular. Durante o metabolismo aeróbico normal, aproximadamente 1 a 3% de todo o oxigênio utilizado na cadeia de transporte de elétrons escapa na forma de radical ânion superóxido e peróxido de hidrogênio (Halliwell; Gutteridge, 2015).

O acúmulo de EROs representa uma ameaça significativa para as células devido ao potencial que estas moléculas apresentam em danificar componentes celulares e todos os tipos de macromoléculas biológicas, tanto direta quanto indiretamente (Junior *et al.*, 2015) As EROs e os radicais livres estão relacionados ao início ou à exacerbação de muitas doenças em organismos vivos, incluindo doenças genéticas degenerativas e processos inflamatórios (Velloso *et al.*, 2009). Esta relação direta entre EROs e patogênese cria uma necessidade contínua por moléculas antioxidantes que possam inativar as EROs e radicais livres,

protegendo assim os sistemas biológicos de seus efeitos deletérios (Velloso *et al.*, 2009).

A relação entre espécies reativas de oxigênio (EROs) e o ciclo celular é complexa e bidirecional. Sendo assim, em plantas as EROs atuam como moléculas sinalizadoras que modulam pontos de controle (*checkpoints*) críticos do ciclo, especialmente nas transições G1/S e G2/M. A desregulação desses *checkpoints* em condições de estresse oxidativo pode comprometer os mecanismos de reparo de DNA e favorecer o acúmulo de danos genômicos (Huang *et al.*, 2019).

Estudos recentes de Mittler *et al.* (2022) demonstram que a sinalização por EROs está intimamente associada à ativação de quinases dependentes de ciclinas (CDKs) e à expressão de genes reguladores do ciclo, influenciando tanto a progressão quanto a parada celular sob estresse. Além disso, a interação entre EROs e hormônios como auxina e citocinina desempenha um papel crucial na coordenação entre divisão celular e respostas adaptativas (Tsukagoshi, 2016). Em contextos de desbalanço redox prolongado, a falha na resposta dos checkpoints pode levar à instabilidade genômica e à sensibilidade a agentes estressores, destacando o papel duplo das EROs como reguladoras fisiológicas e como possíveis indutores de dano quando em excesso (Waszczak, Carmody E Kangasjärvi, 2018).

Os efeitos tóxicos das espécies reativas de oxigênio em sistemas biológicos são amplos e podem afetar múltiplos componentes celulares simultaneamente. A produção aumentada de EROs está diretamente correlacionada com diversos tipos de danos celulares, incluindo fragmentação de DNA, lipoperoxidação de membranas, disfunção mitocondrial e indução de apoptose (Picoli *et al.*, 2021).

Um exemplo, são as mitocôndrias onde o acúmulo de ferro pode causar extensiva peroxidação lipídica e permeabilização de membrana, além de severos danos ao DNA mitocondrial derivados de ataque direto das EROs (Huang *et al.*, 2020). Outra perturbação comum é a exposição a metais pesados, como o cádmio, que eleva significativamente os níveis intracelulares de EROs, resultando em efeitos tóxicos que incluem inibição do crescimento, clorose, disfunção mitocondrial e danos oxidativos a macromoléculas (El Rasafi *et al.*, 2022).

Por outro lado, compostos com propriedades antioxidantes demonstram capacidade de modular simultaneamente os níveis de EROs e a progressão do ciclo celular. Estudos mostram que tratamentos antioxidantes podem reduzir significativamente a produção de

EROs, enquanto exercem efeitos antiproliferativos, interrompendo células na fase S ou reduzindo células em fase G2, demonstrando que a modulação das EROs pode ser utilizada como estratégia para controlar a multiplicação celular (Da Silva *et al.*, 2021).

Em plantas submetidas ao déficit hídrico, as EROs desempenham um papel central nas alterações bioquímicas observadas, onde a superprodução dessas moléculas reativas promove a degradação de pigmentos fotossintéticos, comprometendo a capacidade fotossintética da planta (Rocha *et al.*, 2023). Este contexto demonstra como o estresse abiótico pode desencadear cascatas oxidativas específicas que afetam processos metabólicos fundamentais.

4.5.5 Fosforilação da histona H2AX

A histona H2AX é uma variante da família de histonas H2A que desempenha funções importantes como empacotamento do DNA e reparo de danos ao material genético (Toyoda *et al.*, 2013). Esta proteína sofre fosforilação rápida no resíduo serina 139 em resposta à detecção de quebras de dupla fita do DNA (DSB), sendo esta modificação pós-traducional realizada principalmente pela quinase ATM (ataxia-telangiectasia mutated) (Welch *et al.*, 2022).

O produto desta fosforilação, denominado γ -H2AX, forma-se em grandes regiões da cromatina ao redor dos locais de quebras de dupla fita, levando ao acúmulo de proteínas de reparo, assim como observado na figura 5 (Toyoda *et al.*, 2013). Esta modificação da histona H2AX é essencial para o reconhecimento e reparo das quebras de dupla fita do DNA, constituindo um biomarcador de danos ao DNA (Welch *et al.*, 2022). O reparo adequado dessas quebras é importante, pois esses danos podem levar à instabilidade genômica e ao desenvolvimento de câncer. Desde sua descoberta em 1998, o γ -H2AX tem sido utilizado como ferramenta em múltiplos campos científicos, incluindo a avaliação *in vitro* de drogas pré-clínicas e o screening de genotoxicidade para agentes químicos (Toyoda *et al.*, 2013).

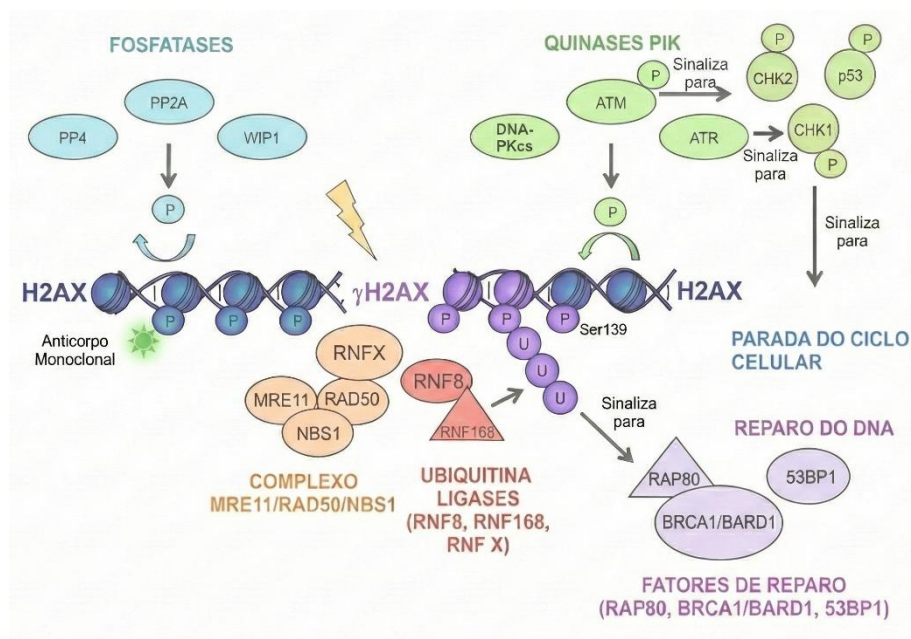


Figura 5: Esquema da fosforilação da histona H2AX. Fonte: Adaptado de FELGENTREFF, *et al.* 2022.

Uma característica notável do mecanismo é a extensão da fosforilação na cromatina, sendo a fosforilação da histona H2AX é realizada pela quinase ATM, que fosforila todas as histonas H2AX na proximidade do local da quebra dupla do DNA, com uma média de 13 moléculas de H2AX envolvidas por evento de dano. O γ -H2AX se propaga na cromatina vizinha para formar domínios cromáticos de extensão megabase (Caron *et al.*, 2015).

A nível molecular, o γ -H2AX serve como âncora para MDC1, que é considerado mediador de todas as funções dependentes de γ -H2AX. Embora não seja necessário para seu recrutamento inicial, o módulo γ -H2AX/MDC1 é necessário para o acúmulo e retenção de fatores de reparo do DNA nas quebras de dupla fita (Caron *et al.*, 2015). O γ -H2AX recruta outros fatores, como 53BP1, BRCA1, MDC1, e o complexo MRE11-RAD50-NBS1 (MRN) para locais de dano (Ali *et al.*, 2020).

O artigo de revisão de Mah *et al.* (2010) discute explicitamente o papel do γ H2AX no envelhecimento, em doenças neurodegenerativas e em condições de estresse oxidativo, incluindo dano cerebral por isquemia e inflamação crônica. Em modelos de epilepsia, clusters de convulsões induzem rapidamente γ -H2AX em múltiplas populações neuronais no hipocampo e córtex entorrinal, demonstrando sua utilidade como indicador especialmente sensível de comprometimento neuronal (Makita *et al.*, 2015).

A detecção do γ -H2AX por citometria de fluxo permite análise quantitativa dos níveis de fosforilação da serina 139, fornecendo um indicador confiável de danos globais ao DNA (Rodriguez-Cortez *et al.*, 2020). Esta metodologia tem sido aplicada em estudos de toxicidade, onde a correlação entre expressão de microRNAs induzida por carcinógenos e aumento do marcador γ -H2AX demonstra a utilidade do biomarcador na avaliação de efeitos genotóxicos (He *et al.*, 2016).

4.5.6 Anexina V

A análise por anexina V e iodeto de propídio é uma metodologia utilizada para a detecção e caracterização de morte celular (Daraba *et al.*, 2020). A anexina V é uma proteína de ligação a fosfolipídios dependente de cálcio que possui alta afinidade pela fosfatidilserina (PS), a qual é translocada da camada interna para a externa da membrana plasmática durante o processo apoptótico (Szwed *et al.*, 2020). Esta translocação da PS representa uma das características da apoptose, tornando-a acessível para ligação com a anexina V na superfície celular externa (Botelho *et al.*, 2024).

Dessa maneira, ocorre uma ligação entre o iodeto de propídio e o DNA, sendo capaz de penetrar apenas em células mortas ou com membranas danificadas (Szwed *et al.*, 2020). A combinação destes dois marcadores permite a diferenciação entre células viáveis, em apoptose precoce, apoptose tardia e necrótica. Esta classificação baseia-se no padrão de marcação: células viáveis (anexina V negativo/PI negativo), apoptose precoce (anexina V positivo/PI negativo), apoptose tardia (anexina V positivo/PI positivo), e necrose (anexina V negativo/PI positivo) (Szwed *et al.*, 2020).

O ensaio da anexina V reforça a importância de modelos fisiológicos de estresse tumoral e corrobora com o teste, sendo um ferramenta na análise de apoptose em oncologia. Assim como descrito no estudo de Worsley *et al.* (2022), os autores apresentaram um protocolo para induzir e detectar a apoptose em linhagens de câncer sólido. Sendo assim, eles demonstram que a acidose do microambiente (pH reduzido) mimetiza condições do tumor e induz morte celular programada, de forma comparável a indutores químicos como estaurosporina. Para a detecção, eles validaram o ensaio de Anexina V por citometria de fluxo como método sensível para distinguir entre células viáveis, em apoptose precoce (Anexina V⁺/PI⁻), tardia (Anexina V⁺/PI⁺) e necróticas. Portanto, esse teste evidencia que investigar os mecanismos de apoptose no contexto do câncer é crucial não apenas para

compreender os processos de evasão celular que sustentam a tumorigênese, mas também para desenvolver estratégias terapêuticas mais precisas.

5- REFERÊNCIAS

ADAN, Aysun; KIRAZ, Yagmur; BARAN, Yusuf. Cell proliferation and cytotoxicity assays. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 17, n. 14, p. 1213-1221, 2016.

ADEBAYO, Salmon A. *et al.* The anti-inflammatory and antioxidant activity of 25 plant species used traditionally to treat pain in southern African. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 15, n. 1, p. 159, 2015.

ADEKIYA, Aruna Olasekan *et al.* Enhancing cassava yield value and profitability through *Tithonia diversifolia* and cow dung applications in a tropical derived savanna Alfisol. **Scientific Reports**, v. 15, n. 1, p. 42684, 2025.

AFZAL, Sajida; KHAN, Siraj; AMMARULLAH, Muhammad Imam. Comprehensive biomedicine assessment of *Apteranthes tuberculata* extracts: Phytochemical analysis and multifaceted pharmacological evaluation in animal models. **Open Medicine**, v. 20, n. 1, p. 20241092, 2025.

AHAMED, Feroze; MURUGAN, Marudhamuthu. Isolation and characterization of marine endophytic fungi from seaweeds, and bioactivity of their crude extracts. **J. Pure Appl. Microbiol**, v. 13, n. 3, p. 1451-1460, 2019.

ALI, Shazia *et al.* Cell Cycle and Factors Involved in Inhibition or Progression of Breast Cancer. In: **Breast Cancer Biology**. IntechOpen, 2020.

ALUM, Esther Ugo *et al.* Endogenous Plant signals and human Health: Molecular mechanisms, ecological functions, and therapeutic Prospects. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 43, p. 102114, 2025.

ALVES, Amanda Soares; BUENO, Valquiria. Imunosenescência: participação de

linfócitos T e células mieloides supressoras nas alterações da resposta imune relacionadas ao envelhecimento. **Einstein (São Paulo)**, v. 17, p. eRB4733, 2019.

ANANTHARAJU, Preethi G. et al. An overview on the role of dietary phenolics for the treatment of cancers. **Nutrition journal**, v. 15, n. 1, p. 99, 2016.

ATANASOV, Atanas G. *et al.* Natural products in drug discovery: advances and opportunities. **Nature reviews Drug discovery**, v. 20, n. 3, p. 200-216, 2021.

BENKHAIRA, Nesrine; KORAICHI, S. I.; FIKRI-BENBRAHIM, Kawtar. *In vitro* methods to study antioxidant and some biological activities of essential oils: a review. **Biointerface Res. Appl. Chem**, v. 12, n. 3, p. 3332, 2022.

BETETO, Flávia Maria. **Bioacessibilidade, atividade antioxidante e antiproliferativa de compostos bioativos fenólicos de sucos de frutos da família Myrtaceae**. 2015. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

BORGES, Juliana Silva Garcia *et al.* Berries and leukemia: a systematic review of experimental studies and the *in vitro* effect of ellagic acid on chronic myeloid leukemia cells. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 3, p. 4422-4450, 2020.

BOTELHO, Marco Antonio; QUEIROZ, Dinalva Brito. Testosterone nanoemulsion prevents prostate cancer: PC-3 and LNCaP cell viability *in vitro*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 14, p. 7729, 2024.

CARON, Pierre *et al.* Non-redundant functions of ATM and DNA-PKcs in response to DNA double-strand breaks. **Cell Reports**, v. 13, n. 8, p. 1598-1609, 2015.

CHANDRAMOULEESWARAN, S.; RAMKUMAR, Jayshree. Mass spectrometry: a boon to nuclear industry. **Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques**, n. S6, p. 1, 2014.

CRAGG, Gordon M.; NEWMAN, David J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.

DANIEL, Imaobong E.; AKPAN, Ekemini I.; UTAM, Edidiong C. Phytochemical evaluation, antioxidant and antimicrobial activities of various extracts from leaves and stems of *Bryophyllum pinnatum*. **Nepal Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 17-28, 2020.

DAR, Refaz Ahmad *et al.* Exploring the diverse bioactive compounds from medicinal plants: a review. **J. Phytopharm**, v. 12, n. 3, p. 189-195, 2023.

DARABA, Oana Maria *et al.* Antitumoral drug-loaded biocompatible polymeric nanoparticles obtained by non-aqueous emulsion polymerization. **Polymers**, v. 12, n. 5, p. 1018, 2020.

DA SILVA, Cristine Cioato *et al.* Potencial antiproliferativo do óleo essencial de *Origanum majorana* Linn. em células de melanoma e seus efeitos intracelulares em células neoplásicas e não-neoplásicas. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 9, p. e7110917788-e7110917788, 2021.

DE ALMEIDA, Daniela Andrade *et al.* Antibacterial activity of the skin secretion of *Phyllomedusa azurea* (Anura: Hylidae) from the Central Brazil Cerrado. **Revista de Biología Tropical**, v. 67, n. 1, p. 1-10, 2019.

DE FERNANDES, Alessandra F. *et al.* *Passalora stromatica* sp. nov. associated with leaf spots of *Tithonia diversifolia* in Brazil. **Ima Fungus**, v. 4, n. 2, p. 201-204, 2013.

DOSSENA, Silvia; MARINO, Angela. Cellular oxidative stress. **Antioxidants**, v. 10, n. 3, p. 399, 2021.

DUTRA, Rafael C. *et al.* Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4-29, 2016.

EL RASAFI, Taoufik *et al.* Cadmium stress in plants: A critical review of the effects, mechanisms, and tolerance strategies. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 52, n. 5, p. 675-726, 2022.

EWANÉ, C. A.; MBANYA, N. T.; BOUDJEKO, T. *Tithonia diversifolia* leaves and stems use as substrate amendment promote the growth of plantain vivoplants in the nursery. **Agricultural Sciences**, v. 11, n. 9, p. 849-859, 2020.

FACHINETTO, J. M.; TEDESCO, S. B. Atividade antiproliferativa e mutagênica dos extratos aquosos de *Baccharis trimera* (Less.) AP de Candolle e *Baccharis articulata* (Lam.) Pers.(Asteraceae) sobre o sistema teste de *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 11, p. 360-367, 2009.

FELGENTREFF, Kerstin *et al.* Biomarkers of DNA damage response enable flow cytometry-based diagnostic to identify inborn DNA repair defects in primary immunodeficiencies. **Journal of clinical immunology**, v. 42, n. 2, p. 286-298, 2022.

FRANKEN, Nicolaas AP *et al.* Clonogenic assay of cells *in vitro*. **Nature Protocols**, v. 1, n. 5, p. 2315-2319, 2006.

GIACOMO, Claudia *et al.* Effects of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray extract on adipocyte differentiation of human mesenchymal stem cells. **Plos one**, v. 10, n. 4, p. e0122320, 2015.

GIRGIN, Münteha; ISIK, Sevim; KANTARCI-CARSIBASI, Nigar. Proposing novel natural compounds against Alzheimer's disease targeting acetylcholinesterase. **Plos one**, v. 18, n. 4, p. e0284994, 2023.

HALLIWELL, Barry; GUTTERIDGE, John MC. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford university press, 2015.

HE, Mingyang *et al.* MicroRNAs, DNA damage response, and cancer treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 12, p. 2087, 2016.

HUANG, Honglin *et al.* Mechanisms of ROS regulation of plant development and stress responses. **Frontiers in plant science**, v. 10, p. 800, 2019.

HUANG, Shaobai *et al.* The roles of mitochondrial reactive oxygen species in cellular signaling and stress response in plants. **Plant Physiology**, v. 171, n. 3, p. 1551-1559, 2016.

IDE, Masahiro *et al.* *Tithonia diversifolia*-derived orizabin suppresses cell adhesion, differentiation, and oxidized LDL accumulation by Akt signaling suppression via PTEN promotion in THP-1 cells. **Journal of Food Biochemistry**, v. 44, n. 7, p. e13268, 2020.

JACOBY, Richard P.; KOPRIVOVA, Anna; KOPRIVA, Stanislav. Pinpointing secondary metabolites that shape the composition and function of the plant microbiome. **Journal of Experimental Botany**, v. 72, n. 1, p. 57-69, 2021.

JUNIOR, CARLOS ABRUNHOSA TAIRUM; ABRUNHOSA, Carlos. **Investigação de Transições Estruturais e da Reatividade Sobre Peróxidos de Tsa1p (Thiol Specific Antioxidant Protein 1) de *Saccharomyces cerevisiae***. 2015. Tese de Doutorado. Instituto Butantan.

KATO-NOGUCHI, Hisashi; KATO, Midori. Defensive compounds involved in the invasiveness of *Tithonia diversifolia*. **Molecules**, v. 30, n. 9, p. 1946, 2025.

KATO-NOGUCHI, Hisashi. Involvement of allelopathy in the invasive potential of *Tithonia diversifolia*. **Plants**, v. 9, n. 6, p. 766, 2020.

KEREBBA, Nasifu *et al.* Evaluation for Feeding Deterrents Against *Sitophilus zeamais* (Motsch.) from *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray. **Journal of Biologically Active Products from Nature**, v. 12, n. 1, p. 77-93, 2022.

KORANKYE, Ernest Asante *et al.* Plant senescence: the role of volatile terpene compounds (VTCs). **American Journal of Plant Sciences**, v. 8, n. 12, p. 3120-3139, 2017.

LE, Vu Anh; PHAN, Cam Quyen Thi; NGUYEN, Thuy Huong. Data mining in mass spectrometry-based proteomics studies. **VNUHCM Journal of Engineering and Technology**, v. 2, n. 4, p. 258-276, 2019.

LIN, Chuan-Yi et al. Anti-metastatic activity of tagitinin C from *Tithonia diversifolia* in a xenograft mouse model of hepatocellular carcinoma. **Livers**, v. 2, n. 4, p. 400-411, 2022.

LOPEZ-GONZALEZ, Laura et al. Exploring biomarkers in breast cancer: Hallmarks of diagnosis, treatment, and follow-up in clinical practice. **Medicina**, v. 60, n. 1, p. 168, 2024.

LOZEMAN, Jasper JA et al. Spectroelectrochemistry, the future of visualizing electrode processes by hyphenating electrochemistry with spectroscopic techniques. **Analyst**, v. 145, n. 7, p. 2482-2509, 2020.

LU, Min-Ren et al. Induction of apoptosis by *Tithonia diversifolia* in human hepatoma cells. **Pharmacognosy magazine**, v. 13, n. 52, p. 702, 2017.

LUNZE, Lubanga et al. Integrated soil fertility management in bean-based cropping systems of Eastern, Central and Southern Africa, **Soil Fertility Improvement and Integrated Nutrient Management-A Global Perspective**, Dr, Joann Whalen (Ed.), v. 35, 2012.

LUO, Landi et al. Development of EST-SSR markers for the invasive plant *Tithonia diversifolia* (Asteraceae). **Applications in Plant Sciences**, v. 4, n. 7, p. 1600011, 2016.

MA, Xin. Recent advances in mass spectrometry-based structural elucidation techniques. **Molecules**, v. 27, n. 19, p. 6466, 2022.

MAH, L. J.; EL-OSTA, A.; KARAGIANNIS, T. C. γ H2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. **Leukemia**, v. 24, n. 4, p. 679-686, 2010.

MAHER, Tahani et al. Medicinal plants with anti-leukemic effects: A review. **Molecules**, v. 26, n. 9, p. 2741, 2021.

MAHNASHI, Mater H. et al. Antioxidant molecules isolated from edible prostrate knotweed: rational derivatization to produce more potent molecules. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2022, n. 1, p. 3127480, 2022.

- MAILU, James Kiamba *et al.* Medicinal plants used in managing diseases of the respiratory system among the Luo community: an appraisal of Kisumu East Sub-County, Kenya. **Chinese Medicine**, v. 15, n. 1, p. 95, 2020.
- MAKITA, Naoki *et al.* Inhibitory effects of valproic acid in DNA double-strand break repair after irradiation in esophageal squamous carcinoma cells. **Oncology reports**, v. 34, n. 3, p. 1185-1192, 2015.
- MANGO, Nelson; HEBINCK, Paul. Agroforestry: A second soil fertility paradigm? A case of soil fertility management in Western Kenya. **Cogent Social Sciences**, v. 2, n. 1, p. 1215779, 2016.
- MATOS, M. S.; ANASTÁCIO, J. D.; NUNES DOS SANTOS, C. Sesquiterpene lactones: promising natural compounds to fight inflammation. **Pharmaceutics**. 2021; 13 (7): 991 [em linha]. 2021.
- MENDOZA, N; SILVA, E. M. E. Introduction to phytochemicals: secondary metabolites from plants with active principles for pharmacological importance. **Phytochemicals: Source of Antioxidants and Role in Disease Prevention**, v. 25, p. 1-5, 2018.
- MERA, IF González; FALCONÍ, DE González; CÓRDOVA, V. Morera. Secondary metabolites in plants: Main classes, phytochemical analysis and pharmacological activities. **Rev. Bionatura**, v. 4, n. 4, 2019.
- MERCILINE, Oloo; DOMINIC, Menge. Phytochemical screening and antimicrobial activity of crude extract of *Tithonia diversifolia*. 2020.
- MITTLER, Ron *et al.* Reactive oxygen species signalling in plant stress responses. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 23, n. 10, p. 663-679, 2022.
- MKINDI, Angela *et al.* The potential of using indigenous pesticidal plants for insect pest control to small scale farmers in Africa. 2015.
- MONISHA, M. *et al.* Extraction of bio active compounds from *Cassia Auriculata* pods and

leaves and its medicinal uses. **Int J Curr Microbiol App Sci**, v. 6, n. 8, p. 425-434, 2017.

MORAES NETO, Roberval Nascimento *et al.* Asteraceae plants as sources of compounds against leishmaniasis and Chagas disease. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, p. 477, 2019.

NANNI, Paolo; GEHRIG, Peter; SCHLAPBACH, Ralph. Mass spectrometry in proteomics: Technologies, methods, and research applications for the life sciences. **Chimia**, v. 76, n. 1-2, p. 73-80, 2022.

NGANDJUI, Yvan Anderson Tchangoue *et al.* Bioactive Potential of *Tithonia diversifolia*: Phytochemical Profiling and Multifunctional Activities. **Chemistry & Biodiversity**, p. e02969, 2025.

NGARIVHUME, Talkmore *et al.* Isolation and antimalarial activity of a new flavonol from *Tithonia diversifolia* leaf extract. **Chemistry**, v. 3, n. 3, p. 854-860, 2021.

NORIEGA, Paco; GORTAIRE, Gabriela; OSORIO, Edison. Mass Spectrometry and Its Importance for the Analysis and. **Natural Drugs From Plants**, p. 33, 2022.

OBIAKARA, Maxwell C.; FOURCADE, Yoan. Climatic niche and potential distribution of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray in Africa. **PLoS One**, v. 13, n. 9, p. e0202421, 2018.

OHIAGU, Franklyn O. *et al.* Anticancer activity of Nigerian medicinal plants: a review. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 1, p. 70, 2021.

OKITI, A. F.; OSUNTOKUN, O. T. Antimicrobial, phytochemical analysis and molecular docking (In-silico Approach) of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray and *Jatropha gossypifolia* L on selected clinical and multi-drug resistant isolates. **Journal of Advances in Microbiology**, v. 20, n. 6, p. 1-18, 2020.

OLAMIGOKE, Loretta *et al.* AHCC activation and selection of human lymphocytes via genotypic and phenotypic changes to an adherent cell type: a possible novel mechanism of

T cell activation. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, n. 1, p. 508746, 2015.

PANG, Zhiqiang *et al.* Linking plant secondary metabolites and plant microbiomes: a review. **Frontiers in plant science**, v. 12, p. 621276, 2021.

PAVIA, Donald L. *et al.* **Introdução à espectroscopia**. Cengage Learning, 2010.

PHARMAWATI, Made; WRASIATI, Luh Putu. Phytochemical screening and FTIR spectroscopy on crude extract from *Enhalus acoroides* leaves. **Malaysian journal of analytical sciences**, v. 24, n. 1, p. 70-77, 2020.

PICOT, L. *et al.* Antiproliferative activity of fish protein hydrolysates on human breast cancer cell lines. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 5, p. 1217-1222, 2006.

PICOLI, T. *et al.* Melittin-induced metabolic changes on the Madin-Darby Bovine Kidney cell line. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 73, p. 352-360, 2021.

PUCK, Theodore T.; MARCUS, Philip I. Action of x-rays on mammalian cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 103, n. 5, p. 653-666, 1956.

RAJČEVIĆ, Nemanja *et al.* Interactions between natural products—A review. **Metabolites**, v. 12, n. 12, p. 1256, 2022.

RICACHENEVSKY, Cleber *et al.* Determinação de cloridrato de fluoxetina em medicamentos por espectroscopia vibracional no infravermelho com transformada de Fourier. **Revista Tecnologia e Tendências**, v. 11, n. 1, p. 149-169, 2020.

ROCHA, Igor *et al.* Biochemical differences in the initial growth of sugarcane varieties cultivated under different potassium doses and water conditions. **Revista Caatinga**, v. 36, p. 61-69, 2023.

RODRÍGUEZ-CORTEZ, Virginia C.; MENÉNDEZ, Pablo. Genotoxicity of permethrin

and clorpyriphos on human stem and progenitor cells at different ontogeny stages: implications in leukaemia development. **EFSA Supporting Publications**, v. 17, n. 5, p. 1866E, 2020.

ROLNIK, Agata; OLAS, Beata. The plants of the Asteraceae family as agents in the protection of human health. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 6, p. 3009, 2021.

SAMPAIO, Bruno Leite; EDRADA-EBEL, RuAngelie; DA COSTA, Fernando Batista. Effect of the environment on the secondary metabolic profile of *Tithonia diversifolia*: a model for environmental metabolomics of plants. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 29265, 2016.

SANJAI, Chetana; GAONKAR, Santosh L.; HAKKIMANE, Sushruta S. Harnessing nature's toolbox: Naturally derived bioactive compounds in nanotechnology enhanced formulations. **ACS Omega**, v. 9, n. 43, p. 43302-43318, 2024.

SÁNCHEZ-MENDOZA, María Elena *et al.* Bioassay-guided isolation of an anti-ulcer compound, tagitinin C, from *Tithonia diversifolia*: role of nitric oxide, prostaglandins and sulfhydryls. **Molecules**, v. 16, n. 1, p. 665-674, 2011.

SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira *et al.* Farmacognosia: do produto natural ao medicamento. **Artmed Editora**, 2016.

STROPARO, Jeferson Luis de Oliveira *et al.* Xenogenic bone grafting biomaterials do not interfere in the viability and proliferation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth-an *in vitro* pilot study. 2021.

SULIMAN, Rasha Saad *et al.* Distinct mechanisms of cytotoxicity in novel nitrogenous heterocycles: future directions for a new anti-cancer agent. **Molecules**, v. 27, n. 8, p. 2409, 2022.

SZWED, Aleksandra *et al.* Generation dependent effects and entrance to mitochondria of

hybrid dendrimers on normal and cancer neuronal cells in vitro. **Biomolecules**, v. 10, n. 3, p. 427, 2020.

TAHER, Mohammad Abdullah *et al.* Phytochemical profiling and bioactivity validation of *Moringa oleifera* leaves: Antimicrobial, antidiarrheal, analgesic, and in silico insights. **Plos One**, v. 20, n. 9, p. e0332048, 2025.

TAIZ, Lincoln *et al.* **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. Artmed Editora, 2017.

TLANKKA, Nicodemus; MBEGA, Ernest; NDAKIDEMI, Patrick. Potential of indigenous pesticidal plants in the control of field and post-harvest arthropod pests in *Bambara groundnuts* (*Vigna subterranea* (L.) Verdc.) in Africa: a Review. 2020.

TOYODA, Takeshi *et al.* Detection of γ -H2AX, a biomarker for DNA double-strand breaks, in urinary bladders of N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine-treated rats. **Journal of toxicologic pathology**, v. 26, n. 2, p. 215-221, 2013.

TRAN, Minh The *et al.* New cytotoxic sesquiterpene lactones from the leaves of *Tithonia diversifolia* and their apoptosis effect evaluation in kb cancer cells. **Chemistry & Biodiversity**, v. 21, n. 12, p. e202401934, 2024.

TSUKAGOSHI, Hironaka. Control of root growth and development by reactive oxygen species. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 29, p. 57-63, 2016.

VELLOSA, José Carlos Rebuglio *et al.* *Salacia campestris* root bark extract: peroxidase inhibition, antioxidant and antiradical profile. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, p. 99-107, 2009.

WANG, Zicong; LIU, Peng-Kai; LI, Lingjun. A tutorial review of labeling methods in mass spectrometry-based quantitative proteomics. **ACS Measurement Science Au**, v. 4, n. 4, p. 315-337, 2024.

WASZCZAK, Cezary; CARMODY, Melanie; KANGASJÄRVI, Jaakko. Reactive oxygen species in plant signaling. **Annual review of plant biology**, v. 69, n. 1, p. 209-236, 2018.

WELCH, Gwyneth M. *et al.* Neurons burdened by DNA double-strand breaks incite microglia activation through antiviral-like signaling in neurodegeneration. **Science Advances**, v. 8, n. 39, p. eabo4662, 2022.

WORSLEY, Catherine M.; VEALE, Rob B.; MAYNE, Elizabeth S. Inducing apoptosis using chemical treatment and acidic pH, and detecting it using the Annexin V flow cytometric assay. **Plos one**, v. 17, n. 6, p. e0270599, 2022.

YANG, Li *et al.* Response of plant secondary metabolites to environmental factors. **Molecules**, v. 23, n. 4, p. 762, 2018.

CAPÍTULO 1 – Modulação geográfica do perfil fitoquímico de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray

Autores: Ana Carolini Cavallieri Zatta¹ • Isadora Maria Coelho Vieira¹ • Lucas Evangelista dos Santos¹ • Maria Gabriela Pissinati Trindade¹ • Vanessa Silva dos Santos¹ • Paula Roberta Costalonga Pereira¹ • Maria do Carmo Pimentel Batitucci¹

⁽¹⁾ Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e Naturais, Departamento de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, CEP 29075-910, Vitória, ES, Brasil.

*Autor para correspondência: anacarolinizatta65@gmail.com

RESUMO

A composição química de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray, amplamente reconhecida por suas propriedades farmacológicas, pode variar significativamente em função de fatores geográficos e fenológicos, influenciando diretamente na sua bioatividade. Este capítulo teve como objetivo caracterizar quimicamente e avaliar a estabilidade temporal de extratos hidroalcoólicos de *T. diversifolia* provenientes de cinco localidades do Espírito Santo (Colatina, Muniz Freire, Viana, UFES-Vitória e Santa Teresa), coletados nos estádios vegetativo (2014) e reprodutivo (2015), com uma coleta adicional em 2024 para duas localidades (UFES e Santa Teresa). A caracterização foi realizada por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), Espectrometria de Massas (ESI-TOF) e análises quimiométricas (PCA e HCA). Os espectros de FTIR confirmaram a presença de grupos funcionais característicos de álcoois, fenóis, lipídios e compostos carbonílicos em todas as amostras. A análise multivariada revelou um agrupamento geográfico distinto, destacando-se as amostras de Santa Teresa por apresentarem o maior distanciamento e variabilidade química ao longo do tempo. A análise por ESI-TOF permitiu a anotação de uma diversificada gama de metabólitos secundários com potencial bioativo, incluindo ácidos hidroxicinâmicos (ácido cafeoilquínico), flavonoides (apigenina, naringenina, hispidulina), lactonas sesquiterpênicas (tagitinina A) e ácidos graxos. A avaliação da estabilidade após uma década de armazenamento mostrou que a composição qualitativa manteve-se relativamente preservada na maioria das localidades, com exceção de Santa Teresa, onde mudanças quantitativas foram mais pronunciadas. Conclui-se que a composição química de *T. diversifolia* apresenta variabilidade interpopulacional e temporal significativa, influenciada por fatores geográficos e fenológicos, e que a integração das técnicas analíticas empregadas permitiu estabelecer correlações sólidas entre origem e perfil químico.

Palavras-chave: Caracterização química • FTIR • ESI-TOF •Análise multivariada
•Metabólitos secundários.

ABSTRACT

The chemical composition of *Tithonia diversifolia*, widely recognized for its pharmacological properties, can vary significantly due to geographical and phenological factors, directly influencing its bioactivity. This chapter aimed to chemically characterize and evaluate the temporal stability of hydroalcoholic extracts of *T. diversifolia* from five locations in Espírito Santo (Colatina, Muniz Freire, Viana, UFES-Vitória, and Santa Teresa), collected at vegetative (2014) and reproductive (2015) stages, with an additional collection in 2024 for two locations (UFES and Santa Teresa). Characterization was performed using Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), High-Resolution Electrospray Ionization Mass Spectrometry (ESI-TOF) and chemometric analyses (PCA and HCA). FTIR spectra confirmed the presence of characteristic functional groups of alcohols, phenols, lipids, and carbonyl compounds in all samples. Multivariate analysis revealed a distinct geographical clustering, with samples from Santa Teresa standing out for showing the greatest distance and chemical variability over time. ESI-TOF analysis allowed the annotation of a diverse range of bioactive secondary metabolites, including hydroxycinnamic acids (caffeoylquinic acid), flavonoids (apigenin, naringenin, hispidulin), sesquiterpene lactones (tagitinin A), and fatty acids. The assessment of stability after a decade of storage showed that the qualitative composition remained relatively preserved in most locations, except for Santa Teresa, where quantitative changes were more pronounced. It is concluded that the chemical composition of *T. diversifolia* shows significant inter-populational and temporal variability, influenced by geographical and phenological factors, and that the integration of the analytical techniques employed allowed the establishment of solid correlations between origin and chemical profile.

Keywords: Chemical characterization • FTIR • ESI-TOF • Multivariate analysis • Secondary metabolites.

1. INTRODUÇÃO

O aumento na incidência de doenças crônicas e degenerativas tem impulsionado a busca por compostos naturais com propriedades terapêuticas, especialmente derivados de plantas medicinais. Dentre as espécies promissoras, destaca-se *Tithonia diversifolia* (Asteraceae), popularmente conhecida como 'margaridão' ou 'girassol mexicano', cujos extratos têm propriedades associadas a atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas e, mais recentemente, antiproliferativas (Benkhaira; Koraichi; Fikri-Benbrahim, 2022). Essas propriedades estão intimamente ligadas ao seu perfil químico e consequentemente com os metabólitos secundários, como lactonas sesquiterpênicas, flavonoides, ácidos fenólicos e derivados hidroxicinâmicos, que podem modular vias celulares essenciais.

Apesar do reconhecido potencial bioativo de *T. diversifolia*, a variabilidade química influenciada por fatores geográficos, fenológicos e ambientais, permanece pouco explorada, especialmente em relação à estabilidade temporal dos extratos e sua implicação na atividade biológica. Adicionalmente, a integração de técnicas analíticas avançadas, como espectroscopia no infravermelho (FTIR) e espectrometria de massas (ESI-TOF), com análises quimiométricas (PCA, HCA), pode oferecer uma visão sistêmica da composição química, estabilidade e potencial farmacológico desses extratos.

Diante deste panorama, o presente trabalho teve como objetivo analisar a composição química e a preservação dos compostos de extratos hidroalcoólicos de *Tithonia diversifolia* provenientes de cinco localidades do Espírito Santo, coletados nos estádios vegetativo (2014 e 2024) e reprodutivo (2015), correlacionando os perfis químicos com as variáveis fenológicas e geográficas.

Diante deste panorama, o presente trabalho teve como objetivo analisar a composição química e a preservação dos compostos de extratos hidroalcoólicos de *Tithonia diversifolia* provenientes de cinco localidades do Espírito Santo, coletados nos estádios vegetativo (2014 e 2024) e reprodutivo (2015), correlacionando os perfis químicos com as variáveis fenológicas e geográficas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Obtenção dos extratos

O material avaliado faz parte do Banco de Extratos do Laboratório de Genética de Plantas e Toxicológica da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Os extratos hidroalcoólicos de *Tithonia diversifolia* foram provenientes das folhas de plantas coletadas de cinco localidades do Espírito Santo: Colatina, Muniz Freire, Viana, Ufes-Vitória e Santa Teresa, nos estádios vegetativo e reprodutivo em 2014 e 2015 respectivamente. Os extratos foram produzidos nos mesmos anos das coletas e obtidos por meio de maceração à exaustão em etanol a 70%, protegido da luz em temperatura ambiente, etapa realizada pela Dr^a. Irany Rodrigues Pretti. Após a preparação, os extratos foram devidamente acondicionados em *freezer* (-20 °C), protegidos da incidência de luz e do calor, e mantidos em recipientes hermeticamente vedados, a fim de preservar sua estabilidade físico-química até a realização das análises experimentais.

2.2. Espectroscopia no Infravermelho

Para inferir a composição atual e o perfil químico dos extratos vegetais, utilizou-se a Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) com o equipamento Cary 360 FTIR (Agilent Technologies, EUA). Cada alíquota de extrato foi depositada, individualmente e diretamente, no aparelho para obtenção dos espectrogramas. Os dados coletados foram analisados utilizando o software OriginPro® 2024 e os resultados foram interpretados e comparados entre si.

2.3. Análise Multivariada

Os dados espectrais foram pré-processados usando a extensão PLS-Toolbox disponível no software MATLAB, versão R2024B (The MathWorks Inc.; Eigenvector Research Inc.). Para melhorar a qualidade dos dados, foram aplicados métodos de suavização e correção de espalhamento. O suavizamento foi realizado usando o algoritmo Savitzky-Golay (ordem 2, janela de 15 pontos) para reduzir o ruído nos espectros. Além disso, os dados foram centrados na média (MC), e a correção multiplicativa de espalhamento (MSC) foi aplicada para ajustar possíveis variações no espalhamento de base.

2.4. Espectrometria de Massas por Ionização por Eletrospray (ESI-TOF)

As análises foram conduzidas em um espectrômetro de massas modelo maXis impact (Bruker Daltonics) do tipo Q-TOF, equipado com uma fonte de ionização por electrospray (ESI). O sistema operou de forma alternada nos modos positivo e negativo. As amostras, preparadas em concentração de 1 mg/mL em metanol, foram injetadas diretamente com um fluxo de 3 $\mu\text{L}/\text{min}$. Os parâmetros de ionização configurados foram: tensão do capilar de 4500 V (modo positivo) ou 3200 V (modo negativo), pressão do gás de nebulização de 1.0 Bar e temperatura de dessolvatação de 200 °C. Os espectros foram adquiridos na faixa de m/z de 50 a 1500, com uma resolução de aproximadamente 60.000 (definida pela largura a meia altura, FWHM, em m/z 400). O processamento dos dados foi realizado com o software DataAnalysis 5.0 (Bruker Daltonics), e as atribuições foram consideradas válidas apenas quando apresentaram um erro de massa igual ou inferior a 15 ppm. Além disso, foi considerado um erro de massa de ± 15 ppm e os íons adductos positivos ([M+H], [M+NH₄], [M+Na], [M+K], [2M+H]), já os adductos negativos ([M-H], [M-H₂O-H], [M-Cl], [2M+H]).

2.5 Análise estatística

Para todos os experimentos, as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de α foi inferior a 0,05 ($p < 0,05$). Para as análises químicas, os espectros de FTIR foram processados e gerados no software OriginPro® 2024. As análises multivariadas, incluindo a Análise de Componentes Principais (PCA) e a Análise por Agrupamentos Hierárquicos (HCA), foram realizadas no *software* MATLAB, utilizando os recursos da PLS-Toolbox. Para a análise dos espectros de massas produzidos foi utilizado o Software Compass Data Analysis 4.0. Para a verificação das substâncias foram escolhidos os menores erros (ppm) e para a anotação dos compostos foi utilizada a comparação com os artigos referências e o uso da base de dados e *PubChem*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Espectroscopia no Infravermelho- FTIR

A análise dos espectros de FTIR dos extratos de *Tithonia diversifolia* contribuiu para o estudo da composição de funções orgânicas presentes no complexo detalhada dos extratos vegetais. A interpretação da espectroscopia foi realizada com base nos trabalhos de Lopes e Fascio (2004), Carballo *et al.*, (2008), Movasaghi *et al.* (2008), Oliveira *et al.* (2016), Pavia *et al.* (2010) e Thombare *et al.* (2023). Em suas análises foram identificadas regiões na faixa de comprimento de onda entre 4000-250 cm^{-1} (figura 6).

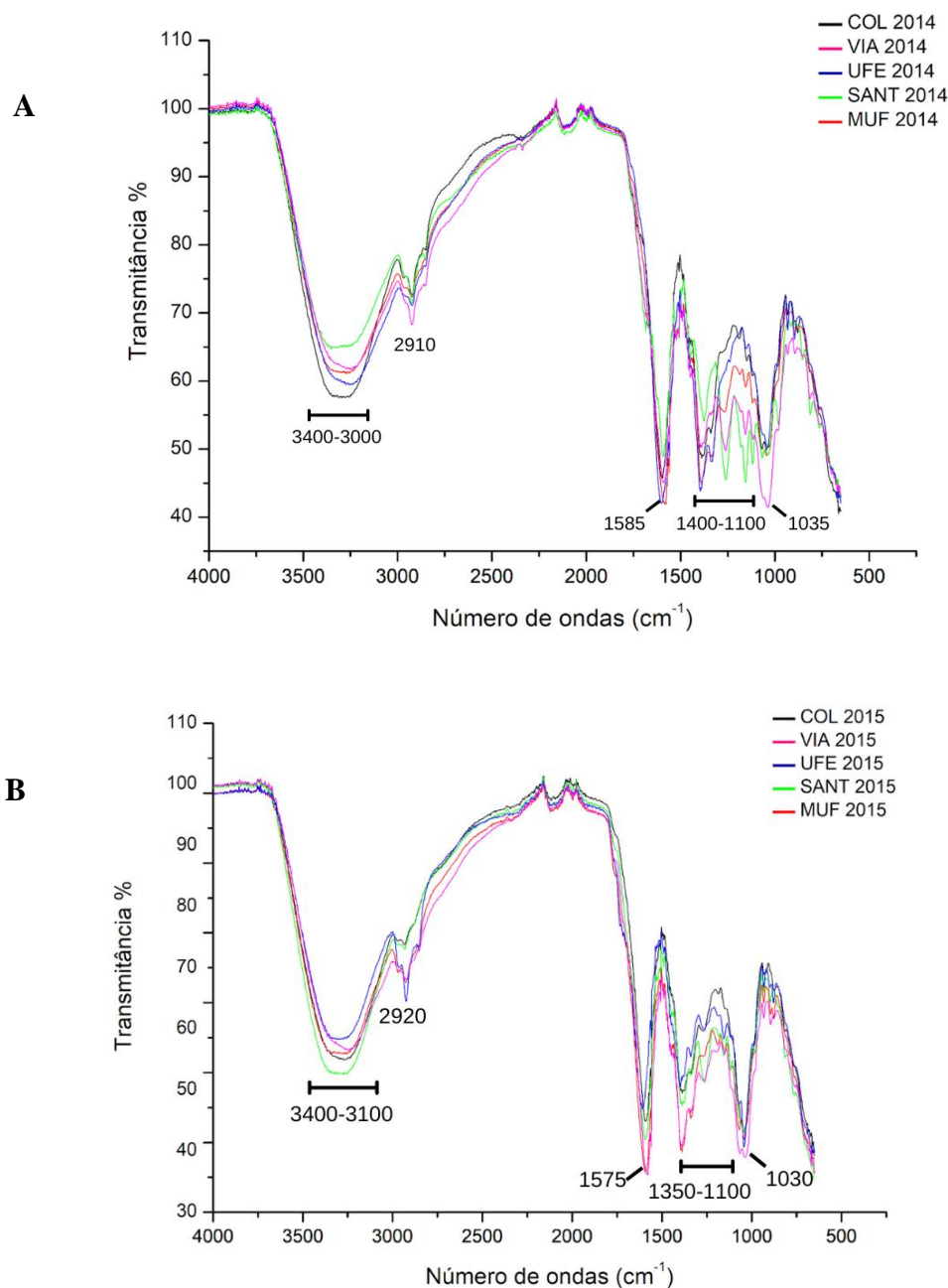


Figura 6 – Espectros de FTIR de extratos hidroalcoólicos de folhas de *Tithonia diversifolia* provenientes de cinco localidades do Espírito Santo. (A) Espectros de FTIR dos extratos obtidos no ano de 2014; (B) espectros de FTIR dos extratos obtidos no ano de 2015. COL (Colatina), VIA (Viana), UFE (Ufes), SANT (Santa Teresa) e MUF (Muniz Freire).

A partir dos espectros analisados dos extratos de folhas de *Tithonia diversifolia* das cinco localidades dos anos de 2014 e 2015, pode-se observar que em todos os extratos foram identificados bandas de absorção largas entre 3100–3400 cm^{-1} , atribuídas ao estiramento de ligações O–H, essas características pertencem ao grupo dos álcoois, fenóis e possíveis flavonoides (tabela 3). Além disso, a ampliação da banda nessa região, observada na Figura 6A, pode estar associada à presença de água e/ou ao aumento de interações por ligações de hidrogênio, possivelmente relacionado ao tempo de armazenamento dos extratos.

Tabela 3: Bandas de FTIR e grupos funcionais correspondentes identificados nas amostras de *Tithonia diversifolia*. Fonte: Autoria própria.

Item	Número de onda (cm^{-1})	Grupo funcional / Atribuição química
1	3320	Estiramento O–H (álcoois, fenóis, polióis)
2	2900–2850	Estiramento C–H (alifáticos; presença de ácidos graxos como ácido octadecanoico)
3	2240	Estiramento C–H alifático (lipídios e hidrocarbonetos)
4	1740–1690	Estiramento C=O (carbonilas de aldeídos, cetonas e lactonas)
5	1692	Estiramento N–H (aminas primárias)
6	1615	Estiramento C=C (anel aromático; fenóis e terpenoides)
7	1555	Estiramento C–N (aminas)
8	1194	Estiramento C–N (aminas aromáticas)
9	1009	Estiramento C–H (polissacarídeos e compostos glicosilados)

A região próxima de 2920–2850 cm^{-1} , observada nas figuras 6A e 6B, correspondem ao estiramento C–H de cadeias alifáticas, sugerindo a presença de constituintes lipídicos. Embora haja variação entre as localidades ao longo dos anos, os picos permanecem nas mesmas regiões espectrais, indicando a presença de compostos químicos semelhantes ou

uma composição química similar, com diferenças na intensidade de transmitância associadas a variações na abundância relativa dos constituintes (Pavia *et al.*, 2010).

Outro intervalo de análise identificado em ambas as imagens, é o de 1600–1500 cm^{-1} apresentou bandas relacionadas ao estiramento C=C de anéis aromáticos e ao estiramento N–H de amidas, reforçando a contribuição de compostos fenólicos e proteínas/derivados nitrogenados. Em estudos anteriores da espécie e da família Asteraceae destacam-se que seus principais constituintes químicos são pertencentes às classes das lactonas sesquiterpênicas (SLs), flavonoides e compostos fenólicos derivados do ácido trans-cinâmico (ROLNIK; OLAS, 2021).

Entre 1400 –1000 cm^{-1} , observou-se um conjunto de bandas intensas atribuídas a vibrações C–O de polissacarídeos, álcoois e éteres, região fortemente associada à presença de carboidratos e glicosídeos. Dessa forma, verificou-se que a maioria das amostras apresentou perfis semelhantes em termos de posição das bandas, embora com diferenças na intensidade da absorbância.

É importante ressaltar, ainda, que a intensidade dos picos apresentados é fundamental para a caracterização das amostras, uma vez que a espectroscopia de FTIR apresenta caráter predominantemente qualitativo, sendo amplamente utilizada para a identificação de grupos funcionais. Contudo, conforme descrito por Pavia *et al.* (2010), a técnica pode fornecer informações semiquantitativas a partir da variação da intensidade das bandas, desde que as amostras sejam analisadas sob as mesmas condições experimentais. Desse modo, bandas com maior intensidade podem indicar maior contribuição relativa de determinados grupamentos químicos, sugerindo que, embora a composição qualitativa seja preservada, ocorrem variações na abundância relativa dos grupos funcionais entre as amostras.

Visando avaliar a estabilidade química dos extratos ao longo do tempo, realizou-se uma coleta adicional de material vegetal em 2024, nas localidades de Santa Teresa e UFES. A seleção desses dois locais considerou critérios logísticos, como proximidade e acessibilidade. Os novos extratos obtidos foram comparados diretamente com aqueles preparados a partir das amostras coletadas dez anos antes, permitindo uma análise do perfil químico após 10 anos de armazenamento (figura 7).

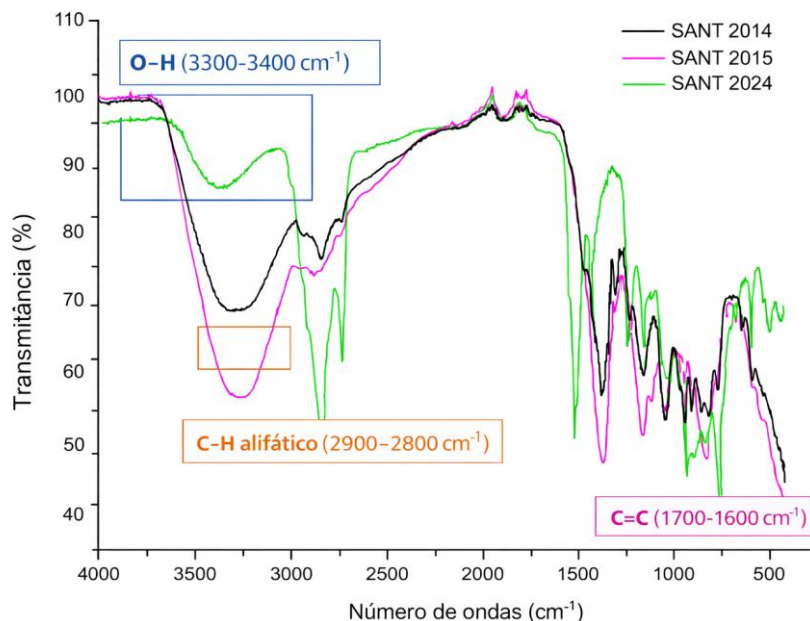


Figura 7: Espectros de FTIR de extratos hidroalcoólicos de folhas de *Tithonia diversifolia* provenientes de UFES e Santa Teresa.

A análise do extrato elaborado das plantas da UFES apresentou sobreposição dos anos, com variações mínimas na forma e intensidade das bandas. Essa proximidade dos espectros sugere que a composição presente nas amostras permaneceu sem muitas modificações em relação aos extratos produzidos há 10 anos, diferentemente do comportamento observado em SANT.

As bandas que são marcantes e características da espécie como: O–H ($3.300\text{--}3.400\text{ cm}^{-1}$), C–H alifático ($2.900\text{--}2.800\text{ cm}^{-1}$), C=C ($1.700\text{--}1.600\text{ cm}^{-1}$) mantiveram-se consistentes entre os anos, indicando que grupos funcionais como álcoois, fenóis, carbonilas, amins e polissacarídeos, normalmente associados a biomoléculas naturais (Dada *et al.*, 2018), permaneceram presentes em proporções muito semelhantes. Vale ressaltar, que extratos de *Tithonia diversifolia* contêm diversas classes de compostos bioativos, como terpenoides, fenóis, amins e ácidos graxos, aos quais são atribuídas atividades biológicas relevantes. A análise comparativa dos espectros FTIR dos extratos de 2014 e 2015, no entanto, revelou um perfil espectral estável ao longo do tempo. Esta estabilidade sugere que esses compostos não sofreram modificações químicas ou degradação significativas durante o período de armazenamento estudado.

Já no extrato da localidade de Santa Teresa, referente ao ano de 2024, observaram-se variações expressivas na transmitância ao longo dos anos, especialmente nas regiões características de O–H, C–H alifático e grupos carbonila, indicando alterações físico-

químicas consistentes na composição molecular das amostras. A banda larga em 3.300–3.400 cm^{-1} , mais intensa em 2015, sugere maior presença de polióis, álcoois e fenóis, grupos associados à estabilização de metabólitos e descritos na literatura por desempenharem papel em processos redutores e de interação molecular (Dada *et al.*, 2018). As oscilações observadas nas bandas de 2.900–2.800 cm^{-1} e na região de 2.240 cm^{-1} refletem flutuações na proporção de C–H alifáticos, compatíveis com compostos lipídicos, incluindo ácidos graxos de cadeia longa como o ácido octadecanoico, reconhecido por suas propriedades antibacterianas e cosméticas.

Além disso, alterações importantes também ocorreram entre 1.700–1.500 cm^{-1} , regiões associadas a vibrações C=O, C=C aromático e N–H/C–N de amins, corroborando a presença de carbonilas, lactonas, terpenoides e amins. Esses grupos funcionais estão relacionados à atividade biológica e descritos como responsáveis por propriedades antimicrobianas e estabilizantes em sistemas vegetais, relatados em *Tithonia diversifolia* (Ogundare, 2007; Anthony *et al.*, 2016).

Dentro desse contexto geral, a análise comparativa entre os anos de produção dos extratos de *Tithonia* coletada em Santa Teresa revelou que, embora SANT4 e SANT5 apresentassem perfis espectrais relativamente semelhantes, a amostra SANT24 exibiu uma modificação diferenciada na intensidade das bandas ao longo de praticamente todo o espectro. Essa alteração, evidente na região de 1.000–1.200 cm^{-1} , pode estar associada a polissacarídeos e compostos glicosilados, ademais na banda próxima de 1.740 cm^{-1} , está relacionada ao estiramento C=O de compostos carboxílicos. Essas mudanças sugerem modificações no perfil de metabólitos estruturais e secundários, uma possível hipótese para essas diferenças está relacionada ao estágio vegetativo da planta no momento da coleta de 2024, fase em que ocorre translocação ativa de compostos e elementos químicos derivados do seu metabolismo essenciais para o preparo do ciclo reprodutivo (Taiz *et al.*, 2017).

Isso pode ser corroborado a partir de resultados prévios de Pretti e colaboradores (2018) do mesmo grupo de pesquisa, na qual reforçam a interpretação ao demonstrar que a população de Santa Teresa apresenta menor similaridade genética em comparação às demais localidades, característica compatível com a reprodução sexuada abundante e a grande diversidade de insetos polinizadores que atuam sobre *T. diversifolia*. Essa maior variabilidade genética pode contribuir para as flutuações metabólicas observadas ao longo dos anos, incluindo o aumento de compostos fenólicos e da atividade antioxidante no estágio vegetativo, conforme também registrado em estudos anteriores Pretti *et al.* (2018).

Dessa forma, as variações espectrais observadas em Santa Teresa ao longo do tempo refletem não apenas modificações ambientais e fenológicas, mas também a própria dinâmica genética da população, resultando em um perfil molecular mais diversificado e instável quando comparado às demais localidades analisadas.

3. 2 *Análise Multivariada*

A fim de complementar a caracterização do FTIR e verificar o nível de similaridade química entre as diferentes localidades foi realizada uma análise quimiométrica dos resultados obtidos, por HCA- Hierarchical Cluster Analysis e PCA Principal Component Analysis-PCA. A análise multivariada integrou os dados obtidos, considerando simultaneamente as múltiplas variáveis experimentais envolvidas: Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise de Agrupamento Hierárquico (HCA). A análise de Agrupamento Hierárquico (HCA) evidenciou a formação de grupos distintos entre as amostras de *Tithonia diversifolia*, revelando algumas características relacionadas à origem geográfica (Figura 8).

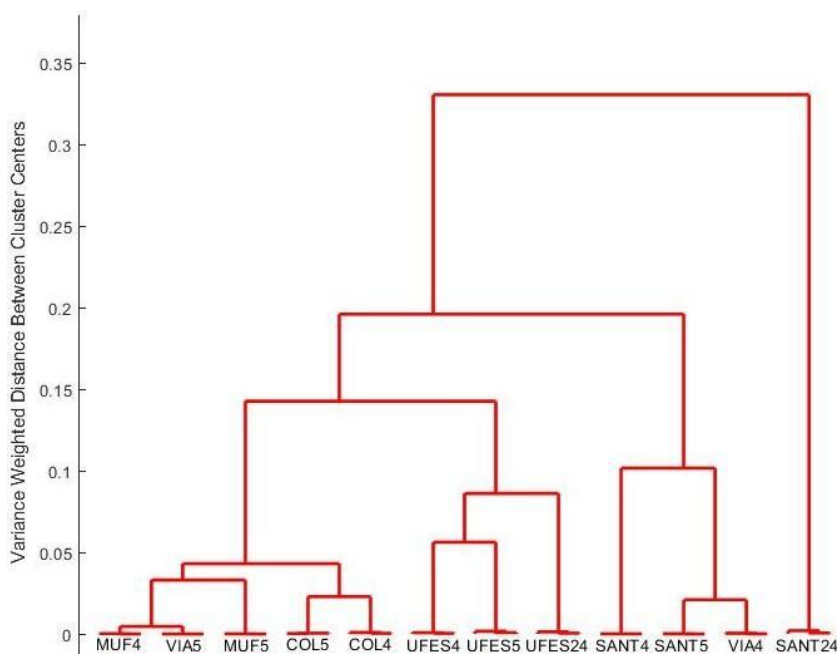


Figura 8: Análise de Agrupamento Hierárquico (HCA) dos extratos de folhas de *Tithonia diversifolia* provenientes de diferentes localidades e anos de coleta.

A estrutura do dendrograma mostra claramente que amostras da mesma localidade tendem a se agrupar, indicando um perfil químico comum dentro de cada região. Isso é evidente nos agrupamentos próximos entre as amostras de UFES, Muniz Freire e Viana (UFES4, UFES5, UFES2, MUF4, MUF5, VIA4, VIA5) e entre as de Colatina (COL4, COL5), sugerindo que

plantas coletadas em uma mesma área geográfica compartilham um perfil metabólico similar.

Entretanto, a amostra de Santa Teresa de 2024 (SANT24) destacou-se como o grupo mais distante de todos, sugerindo diferenças químicas em relação às demais amostras, o que corrobora com a análise de FTIR analisada anteriormente. Uma possível hipótese para esse comportamento é que a coleta de 2024 foi realizada no local a partir de direcionamentos gerais, além de está localizada a áreas adjacentes a uma rodovia de grande fluxo, o que pode ter influenciado o resultado em amostras provenientes de indivíduos distintos ou mesmo de microambientes diferentes dentro da localidade. Sabe-se que fatores de estresse ambiental de origem antrópica, como a poluição e alterações no solo, podem atuar como fatores de estresse abióticos em plantas. Por exemplo, um estudo com *Mentha piperita* coletada em áreas com distintos níveis de poluição veicular observou variações marcantes na composição do óleo essencial e na atividade antioxidante, demonstrando como o estresse antrópico pode modular o metabolismo secundário (GHARIB *et al.*, 2021).

Tais estressores têm o potencial de modular as vias biossintéticas de metabólitos secundários, alterando a produção e o acúmulo de compostos de defesa. Conforme evidenciado por Asiminicesei, Fertu e Gavrilescu (2024), a exposição a metais pesados, frequentemente associados a essas fontes poluidoras, induz estresse oxidativo nas plantas medicinais, levando à superprodução de espécies reativas de oxigênio e à desregulação das rotas metabólicas responsáveis pela síntese de compostos bioativos, como polifenóis, alcaloides e flavonoides.

Um exemplo desse mecanismo foi documentado por Galal e Shehata (2015) em um estudo com *Plantago major*, é uma planta medicinal que, quando cultivada em solos contaminados por metais derivados do tráfego veicular, a planta não só acumula níveis elevados desses contaminantes, mas também reconfigura seu padrão de translocação entre raízes e parte aérea como estratégia de tolerância. Tal reconfiguração fisiológica, destinada a tolerar o estresse, compromete não apenas a capacidade adaptativa da planta, mas também as propriedades terapêuticas, seja pela possível alteração no perfil de bioativos, ou pela contaminação direta do material vegetal com elementos tóxicos.

Já a análise de PCA permitiu visualizar a organização e o grau de similaridade entre os perfis químicos dos extratos de *Tithonia diversifolia*, evidenciando como cada localidade apresenta

padrões distintos ou agrupamentos específicos ao longo dos componentes principais (figura 9).

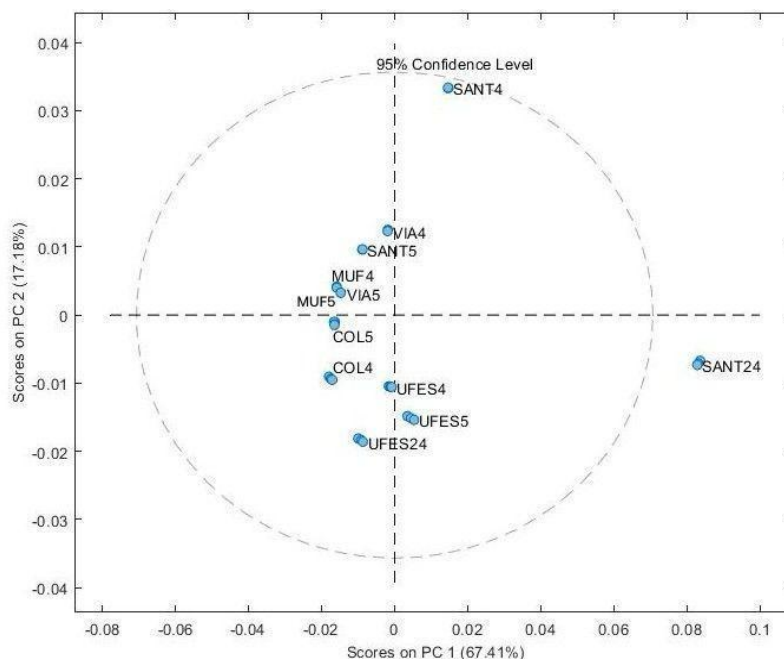


Figura 9: Análise de Componentes Principais (PCA) dos extratos de folhas de *Tithonia diversifolia* provenientes de diferentes localidades e anos de coleta.

Os dois primeiros componentes explicaram conjuntamente 84,6% da variância total dos dados (PC1 = 67,41%; PC2 = 17,18%), indicando que o modelo representa de forma robusta a variação observada. Sendo assim, a representação tem uma proximidade da realidade multidimensional dos dados, isso indica que as informações residuais insignificantes são baixas, o que faz com que haja maior robustez na análise. A partir da análise do gráfico, observou-se um agrupamento consistente das localidades: Colatina, Muniz Freire, UFES e Viana. Esse resultado pode sugerir uniformidade e proximidade na composição química das amostras analisadas formando um grupo coeso.

Em contraste, as amostras de Santa Teresa (SANT4 e SANT24) apresentaram maior distanciamento tanto em relação às demais localidades quanto entre si, posicionando-se em regiões distintas do gráfico, o que sugere uma composição química diferenciada e maior variabilidade dentro da localidade. Tal contribuição está em concordância com os dados quantitativos do estudo, os quais atribuem a Santa Teresa os mais elevados teores de fenóis, flavonoides e taninos, bem como a maior atividade antioxidante entre todas as populações avaliadas (PRETTI *et al.*, 2018). Portanto, o agrupamento distinto observado nas análises de HCA e PCA não é uma análise estatística, mas a representação de uma interação entre o

genótipo dessa população e as condições específicas de seu habitat (altitude elevada, temperaturas mais baixas e solo rico em micronutrientes).

De acordo com Pretti e colaboradores (2018) a análise de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA- DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso), revelou que Santa Teresa possui baixa similaridade genética (0,12) com as demais populações, indicando que seu agrupamento não está correlacionado com a proximidade geográfica, mas sim com fatores intrínsecos e ambientais específicos. Esses resultados apontam que fatores geográficos e/ou fenológicos podem estar associados à heterogeneidade química observada, sendo particularmente marcante no caso das amostras de Santa Teresa demonstrado também em outras análises como a de HCA e FTIR.

3.3 Análise de ESI-TOF

A análise por espectrometria de massas dos extratos de *Tithonia diversifolia* permitiu identificar tentativamente e caracterizar os principais metabólitos presentes nas amostras, evidenciando um conjunto diverso de compostos pertencentes a diferentes classes químicas. A interpretação dos íons detectados foi realizada com base nos estudos de Araújo *et al.* (2021), Kerebba *et al.* (2022), Gallon *et al.* (2019), Wang *et al.* (2025) e Paula (2013), que forneceram suporte para a possível identificação estrutural e comparação dos perfis químicos entre as localidades.

A espectrometria de massas por Eletrospray ESI-TOF, foi realizada no Centro Multiusuário de Biomoléculas (CEMBio-RJ), permitiu traçar um perfil metabolômico comparativo das amostras coletadas nas cinco localidades: Viana, Muniz Freire, Santa Teresa, Vitória-campus da UFES e Colatina. O processamento dos dados levou à anotação de 20 metabólitos secundários conhecidos e 6 desconhecidos, assim como observados na tabela 4.

Compostos	VIA		MUF		SANT		UFES			COL		Fórmula Molecular	[M-H]	[M+H]	DBE	
														[M+Na]		
	4	5	4	5	4	5	24	4	5	24	4			5		[M+K]
Ácido p-cumárico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	C ₉ H ₈ O ₃	163.0398		6
Ácido quínico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	C ₇ H ₁₂ O ₆	191.056		2
Ácido glucárico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	C ₁₀ H ₉ O ₅	209.0437		6
Desconhecido	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	C ₁₂ H ₁₇ O ₅	241.1070		4
Ácido palmítico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	C ₁₆ H ₃₁ O ₂	255.2337		11
Desconhecido	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	C ₁₅ H ₁₅ O ₄	259.0974		9
Austricina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	C ₁₅ H ₁₇ O ₄	261.1133		8
Apigenina	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	C ₁₅ H ₉ O ₅	269.0421		6
Naringenina	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	271.0616		10
Ácido pinolênico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	277.2169		4
Ácido gama-linolênico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	279.2302		3
Ácido 4-O-cafeoil-2-hidroxi- butanoico (4-CUBA)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	C ₁₄ H ₁₃ O ₇	293.0644		9
Hispidulina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	C ₁₆ H ₁₁ O ₆	299.0565		11
6-metil luteolina	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	C ₁₆ H ₁₁ O ₇	315.0499		6

Ácido oxo-di-hidroxi octadecenoico	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	$C_{18}H_{33}O_5$	329.2285	3
Desconhecido	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	$C_{18}H_{28}O_6$	339.1794	5
Ácido cafeoilquínico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	$C_{16}H_{18}O_9$	353.0867	9
Tagitinina A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	$C_{19}H_{27}O_7$	367.1699	14
Ácidos dicafeoilquínico isômeros	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	$C_{25}H_{24}O_{12}$	515.1562	14
Ácido cafeoil-5-feruloylquínico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	$C_{26}H_{26}O_{12}$	529.1535	10
Desconhecido	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	$C_{39}H_{40}O_4$	571.2917	20
Hexosídeo de kaempferol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	$C_{27}H_{29}O_{16}$	609.1829	13
Derivado de cafeoil glicerol	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	$C_{30}H_{33}O_{14}$	617.1912	14
Desconhecido	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	$C_{28}H_{31}O_{16}$	623,1619	13
Dímeros de proantocianidina ((epi)catequina-4,8-(epi)catequina C-hexosídeo)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	$C_{43}H_{47}O_{11}$	739.3146	21
Desconhecido	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	$C_{55}H_{112}O_2$	805.8614	0

Tabela 4 – Compostos detectados por análise de espectrometria de massas com ionização por Eletrospray ESI-TOF. DBE = Índice de deficiência de hidrogênio (double bond equivalent). O sinal (+) indica a presença do composto e (-) indica ausência. Os valores numéricos referem-se aos extratos obtidos nos diferentes anos de coleta, sendo: 4 = extrato de 2014; 5 = extrato de 2015; e 24 = extrato de 2024.

Para facilitar a compreensão, estes compostos foram agrupados em classes químicas de acordo com a tabela abaixo e relacionados com suas propriedades (tabela 5).

Tabela 5: Principais classes químicas e compostos anotados em *Tithonia diversifolia*. Fonte: Autoria própria.

Categoria química	Compostos anotados	Propriedades
Ácidos hidroxicinâmicos e derivados conjugados	Ácido cafeoilquínico Ácido dicafeoilquínico	Ésteres derivados da via fenilpropanoide; associados a atividade antioxidante e metabólica.
Flavonoides	Naringenina Apigenina e Hispidulina Kaempferol dihexoside	Classe amplamente relacionada à atividade antioxidante, anti-inflamatória e bioativa.
Ácidos graxos saturados e insaturados	Ácido palmítico Ácido γ -linolênico	Compostos lipídicos estruturais e bioativos, participam de rotas metabólicas e processos fisiológicos.
Lactonas sesquiterpênicas	Tagitinina A	Metabólito característico da família Asteraceae; apresenta propriedades anti-inflamatórias e citotóxicas.
Taninos condensados	Dímero de proantocianidina	Polifenóis de alto peso molecular, associados a atividade antioxidante e capacidade de complexação.

O perfil químico obtido revela que o material vegetal das cinco localidades apresenta uma composição rica em metabólitos secundários com potencial sinérgico para as atividades antioxidante e antiproliferativa reportadas na literatura (Zhang *et al.*, 2019). Assim como ilustrado na tabela 5, pode ser observado que a presença de ácidos hidroxicinâmicos e seus derivados (como os ácidos cafeoilquínico e dicafeoilquínico) e de flavonoides (apigenina, naringenina e hispidulina) confere ao extrato uma capacidade antioxidante significativa, além de potencial modulador da proliferação celular (Pang *et al.*, 2021).

Estudos recentes têm destacado o papel de flavonoides como a quercetina, genisteína e apigenina na indução de apoptose em células tumorais, atuando via modulação da expressão das proteínas Bax/Bcl-2, ativação de caspases e liberação de citocromo c (KOPUSTINSKIENE *et al.*, 2020). Esses mecanismos reforçam o potencial quimiopreventivo e antitumoral atribuído a compostos flavonoides presentes no extrato aqui analisado, sugerindo que sua atividade antiproliferativa pode estar associada tanto à ação antioxidante quanto à modulação de vias de morte celular programada.

Segundo Ojo *et al.* (2018) esse mecanismo atua por meio da neutralização direta de radicais livres, quelação de metais pró-oxidantes e possível inibição enzimática, proteção esta complementada pela ação sequestrante dos dímeros de proantocianidina, sendo característico da família Asteraceae (ROLNIK; OLAS, 2021).

Dessa maneira, a análise de massas detectou algumas variações pontuais de alguns compostos com a flavona apigenina, na qual esteve ausente exclusivamente na amostra MUF5. Este padrão foi similar ao observado para a 6-metil luteolina (ausente em MUF5 e VIA5), sugerindo uma modulação específica da via de biossíntese de flavonas metoxiladas nessas amostras.

Outra amostra que apresentou um perfil de distribuição diferenciado foi o ácido oxo-dihidroxi octadecenoico, no qual se apresentou ausente em todos os três anos da amostra UFES, enquanto apareceu de forma irregular nas demais localidades. A presença e a variação nos níveis deste ácido graxo oxigenado sugerem que ele pode pertencer à classe dos mediadores lipídicos oxidados, comumente conhecidos como Oxilipinas na fisiologia vegetal. Esses compostos são derivados da oxidação enzimática ou não-enzimática de ácidos graxos poli-insaturados, como o ácido linolênico e linoleico, e atuam como moléculas sinalizadoras em respostas a estresses bióticos e abióticos (TAIZ *et al.*, 2017). A variação quantitativa entre as populações pode refletir diferenças nas condições ambientais específicas de cada localidade (como incidência luminosa, disponibilidade hídrica ou presença de poluentes) que induzem distintos níveis de estresse oxidativo. Sendo assim, as flutuações observadas neste mediador lipídico não apenas indicam uma resposta adaptativa diferenciada das populações de *Tithonia diversifolia* aos seus microambientes, mas também sugerem variações no potencial bioativo dos extratos.

Vale acrescentar que ausências isoladas, como a do ácido cafeoilquínico em COL5 e do derivado de cafeoil glicerol em VIA4 e SANT5, apontam para uma variabilidade intra-

populacional natural. No geral, os dados demonstram que, embora a espécie estudada apresente alguns compostos marcantes e robustos, a expressão qualitativa de vias metabólicas específicas pode ser modulada por fatores locais, o que admite uma plasticidade fenotípica da planta e fornecendo bases sólidas para futuras investigações quantitativas e estudos de correlação com fatores ambientais.

No que diz respeito à ação antiproliferativa, destaca-se pela sua relevância biológica a apigenina e a naringenina, sendo descrita neste estudo como moduladora de vias de sinalização celular (PI3K/Akt, MAPK) e indutora de apoptose (STABRAUSKIENE *et al.*, 2022). Além disso, a flavona metoxilada hispidulina e o glicosídeo de kaempferol apresentam citotoxicidade seletiva. Em paralelo, lactonas sesquiterpênicas como a tagitinina A e C, estas últimas reportadas por Ranti, Wahyuningsih e Wirohadidjojo (2018) como agentes antifibróticos em fibroblastos de quelóide, também exibem potente atividade citotóxica, atribuída ao grupo α -metileno- γ -lactona, que frequentemente atua via inibição do NF- κ B.

Além disso, as SLs possuem a sua ação está ligada à sua estrutura química, particularmente à presença do grupo α -metileno- γ -lactona, caracterizado por um anel lactônico insaturado, atuando como um potente eletrófilo capaz de realizar reações de alquilação, com resíduos de cisteína em proteínas-alvo. Como destacado por Chadwick *et al.* (2013), esta reatividade é a base molecular para compreender a inibição do fator de transcrição pró-inflamatório NF- κ B, modificação direta de sua subunidade p65 ou pela interferência no complexo I κ B quinase até efeitos citotóxicos e antiproliferativos observados em linhagens celulares cancerígenas.

Portanto, os dados espectrométricos não validam apenas a identidade química da espécie, mas também fornecem uma base química sólida para prever e justificar futuros ensaios farmacológicos destinados a explorar as propriedades quimiopreventivas e antitumorais desses extratos.

4. CONCLUSÕES

O estudo permitiu uma caracterização química e multidimensional de extratos hidroalcoólicos de *Tithonia diversifolia*, revelando um perfil metabólico rico e complexo, dominado por classes de compostos com reconhecida relevância farmacológica. A análise por FTIR confirmou a presença de grupos funcionais característicos de álcoois, fenóis,

carbonilas, amins e polissacarídeos, com padrões espectrais consistentes entre a maioria das localidades, porém com variações quantitativas evidentes, especialmente em Santa Teresa. A aplicação de métodos quimiométricos (PCA e HCA) corroborou a existência de agrupamentos geográficos, destacando Santa Teresa como uma população quimicamente distinta e mais variável ao longo do tempo, esse fato pode estar associado à sua diversidade genética e condições ambientais específicas.

A espectrometria de massas identificou um conjunto diversificado de metabólitos secundários, incluindo ácidos hidroxicinâmicos (ácido cafeoilquínico), flavonoides (apigenina, naringenina, hispidulina), lactonas sesquiterpênicas (tagitinina) e ácidos graxos, consolidando o potencial antioxidante e antiproliferativo reportado para a espécie. A presença de compostos como a apigenina e a tagitinina A, conhecidos por modular vias de sinalização celular, induzir apoptose e inibir o NF- κ B, oferece uma base química para justificar a atividade biológica desses extratos, inclusive em contextos de dano ao DNA e resposta a estresse genotóxico.

A hipótese relacionada a estabilidade temporal após 10 anos de armazenamento indicou que, embora a composição qualitativa tenha sido majoritariamente preservada, especialmente nas amostras da UFES, alterações quantitativas significativas foram observadas em Santa Teresa, reforçando a influência de fatores locais e fenológicos na dinâmica dos metabólitos. Essas variações podem impactar diretamente a reprodutibilidade e a eficácia biológica dos extratos, destacando a necessidade de controle de variáveis ambientais e de coleta.

De modo geral, os resultados obtidos validam a hipótese inicial de que a composição química de *T. diversifolia* varia entre localidades e ao longo do tempo, e que essa variabilidade está associada a diferenças no perfil de metabólitos secundários. A integração das técnicas analíticas empregadas (FTIR, ESI-TOF e quimiometria) permitiu estabelecer possíveis correlações entre origem geográfica, estágio fenológico e perfil químico.

Dessa forma, este trabalho avançou na caracterização química e na avaliação da estabilidade de extratos de *T. diversifolia*, além de estabelecer bases metodológicas e conceituais para explorar seu potencial como fonte de agentes quimiopreventivos e moduladores da resposta celular ao dano genômico, alinhando-se à busca por terapias naturais baseadas em evidências químicas e moleculares. Contudo, destaca-se a necessidade da realização de análises complementares envolvendo a fragmentação dos compostos por espectrometria de massas

(MS/MS), a fim de aprimorar a identificação estrutural e aprofundar a caracterização química do extrato, permitindo maior precisão na elucidação dos metabólitos bioativos responsáveis pelos efeitos observados.

4. REFERÊNCIAS

ANTHONEY, S. T. *et al.* Bioassay screening of the ethanolic extract of *Tithonia diversifolia* leaves on selected microorganisms. **Int J Bioass**, v. 5, p. 4794-8, 2016.

ARAÚJO, Carolina Alves *et al.* Asteraceae family: A review of its allelopathic potential and the case of *Acmella oleracea* and *Sphagneticola trilobata*. **Rodriguésia**, v. 72, p. e01622020, 2021.

ASIMINICESEI, D.-M.; FERTU, D.; GAVRILESCU, M. Impact of heavy metal pollution in the environment on the metabolic profile of medicinal plants and their therapeutic potential. **Plants**, 2024.

CARBALLO, Teresa *et al.* Characterization of different compost extracts using Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) and thermal analysis. **Biodegradation**, v. 19, n. 6, p. 815-830, 2008.

CHADWICK, Martin *et al.* Sesquiterpenoids lactones: benefits to plants and people. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 6, p. 12780-12805, 2013.

DADA, Adewumi O. *et al.* Effect of operational parameters, characterization and antibacterial studies of green synthesis of silver nanoparticles using *Tithonia diversifolia*. **PeerJ**, v. 6, p. e5865, 2018.

GALAL, Tarek M.; SHEHATA, Hanaa S. Bioaccumulation and translocation of heavy metals by *Plantago major* L. grown in contaminated soils under the effect of traffic pollution. **Ecological indicators**, v. 48, p. 244-251, 2015.

GALLON, Marília Elias *et al.* Natural products diversity in plant-insect interaction between *Tithonia diversifolia* (Asteraceae) and *Chlosyne lacinia* (Nymphalidae).

Molecules, v. 24, n. 17, p. 3118, 2019.

GHARIB, Fatma A. *et al.* Heavy metals concentration, and antioxidant activity of the essential oil of the wild mint (*Mentha longifolia* L.) in the Egyptian watercourses.

International Journal of Phytoremediation, v. 23, n. 6, p. 641-651, 2021.

KEREBBA, Nasifu *et al.* UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS Characterisation of Phenolic Compounds from *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray and Antioxidant Activity.

ChemistrySelect, v. 7, n. 16, p. e202104406, 2022.

KOPUSTINSKIENE, Dalia M. *et al.* Flavonoids as anticancer agents. *Nutrients*, v. 12, n. 2, p. 457, 2020.

LOPES, Wilson Araújo; FASCIO, Miguel. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química nova**, v. 27, p. 670-673, 2004.

MOVASAGHI, Z.; REHMAN, S.; UR REHMAN, I. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 43, n. 2, p. 134-179, 2008.

OGUNDARE, A. O. Antimicrobial effect of *Tithonia diversifolia* and *Jatropha gossypifolia* leaf extracts. 2007.

OJO, Oluwafemi Adeleke *et al.* HPLC-DAD fingerprinting analysis, antioxidant activities of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray leaves and its inhibition of key enzymes linked to Alzheimer's disease. **Toxicology Reports**, v. 5, p. 585-592, 2018.

OLIVEIRA, Renata Nunes *et al.* FTIR analysis and quantification of phenols and flavonoids of five commercially available plants extracts used in wound healing. **Matéria (Rio de Janeiro)**, v. 21, n. 03, p. 767-779, 2016.

PANG, Zhiqiang *et al.* Linking plant secondary metabolites and plant microbiomes: a review. **Frontiers in plant science**, v. 12, p. 621276, 2021.

PAULA, Daniela Aparecida. Estudos metabolômicos de Asteraceae por UPLC-UV-HRFTMS, avaliação do potencial anti-inflamatório *in vitro* e suas correlações através de métodos *in silico*. 2013. 82 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

PAVIA, D. L. *et al.* Introdução à espectroscopia: Tradução da 4ª edição norte-americana. **São Paulo: Cengage Learning**, 2010.

PRETTI, Irazy Rodrigues *et al.* Variation of biochemical and antioxidant activity with respect to the phenological stage of *Tithonia diversifolia* Hemsl.(Asteraceae) populations. **Industrial Crops and Products**, v. 121, p. 241-249, 2018.

RANTI, Imaniar; WAHYUNINGSIH, Mae Sri Hartati; WIROHADIDJOJO, Yohannes Widodo. The antifibrotic effect of isolate tagitinin C from *Tithonia diversifolia* (Hemsley) A. Gray on keloid fibroblast cell. **Pan African Medical Journal**, v. 30, n. 1, 2018.

ROLNIK, Agata; OLAS, Beata. The plants of the Asteraceae family as agents in the protection of human health. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 6, p. 3009, 2021.

STABRAUSKIENE, Jolita *et al.* Naringin and naringenin: Their mechanisms of action and the potential anticancer activities. **Biomedicines**, v. 10, n. 7, p. 1686, 2022.

TAIZ, Lincoln *et al.* Fisiologia e desenvolvimento vegetal. Artmed Editora, 2017.

THOMBARE, Nandkishore *et al.* Comparative FTIR characterization of various natural gums: a criterion for their identification. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 31, n. 8, p. 3372-3380, 2023.

WANG, Zhandi *et al.* Unveiling insecticidal compounds from the invasive weed *Tithonia diversifolia* against *Spodoptera litura* and elucidating mechanisms via transcriptomic

analysis. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 210, p. 106354, 2025.

ZHANG, Lijuan; VIRGOUS, Carlos; SI, Hongwei. Synergistic anti-inflammatory effects and mechanisms of combined phytochemicals. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 69, p. 19-30, 2019.

CAPÍTULO 2 – Avaliação *in vitro* da atividade antiproliferativa de extratos de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray

Autores: Ana Carolini Cavallieri Zatta¹ • Enzo Zini² • Daniela Morais Leme² • Maira Trancozo¹ • Mirieli Bernardes Xavier¹ • Maria do Carmo Pimentel Batitucci¹

Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e Naturais,
Departamento de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal,
CEP 29075-910, Vitória, ES, Brasil.

⁽²⁾ Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas Departamento de
Genética, CEP 81530-001, Curitiba, PR, Brasil.

*Autor para correspondência: anacarolinizatta65@gmail.com

RESUMO

A atividade antiproliferativa seletiva contra células tumorais é uma propriedade farmacológica importante para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. Este capítulo teve como objetivo avaliar *in vitro* a atividade antiproliferativa e os mecanismos de ação dos extratos hidroalcoólicos de *Tithonia diversifolia*, caracterizados no Capítulo 1, sobre as linhagens celulares MCF-7 (carcinoma de mama) e MCF-10A (não tumoral). Os extratos, provenientes de cinco locais do Espírito Santo (Colatina, Muniz Freire, Viana, UFES-Vitória e Santa Teresa) e coletados em 2014 e 2015, com uma coleta subsequente em 2024 também realizada em dois locais (UFES e Santa Teresa), foram submetidos a uma série de ensaios biológicos. A citotoxicidade e a seletividade foram inicialmente avaliadas pelo ensaio de MTT, e os extratos seletivos (Índice de Seletividade - IS > 2,0) foram posteriormente investigados em ensaios de proliferação (cristal violeta) e clonogenicidade. Os mecanismos de ação foram elucidados por meio de análises de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), distribuição do ciclo celular, fosforilação da histona H2AX (γ -H2AX) e apoptose (Anexina V/PI), utilizando citometria de fluxo em colaboração com a Universidade Federal do Paraná (UFPR). Os resultados demonstraram que os extratos exibiram atividade antiproliferativa concentração-dependente contra células MCF-7. Os extratos MUF4 e MUF5 de Muniz Freire destacaram-se com os maiores índices de seletividade (IS > 2,2) e foram selecionados para investigação detalhada. Esses extratos inibiram significativamente a proliferação e a formação de colônias de células MCF-7. Os mecanismos subjacentes envolveram a indução de um aumento significativo de EROs, parada do ciclo celular (nas fases S e G2/M) e ativação da apoptose (até 90% das células).

Notavelmente, não foi detectada indução de γ -H2AX, indicando que a citotoxicidade não é mediada por dano genotóxico direto ao DNA, mas sim por estresse oxidativo e ruptura da homeostase celular. Conclui-se que os extratos de *T. diversifolia*, particularmente os de Muniz Freire, possuem atividade antiproliferativa seletiva contra células de câncer de mama *in vitro*, reforçando o potencial terapêutico da espécie.

Palavras-chaves: Atividade antiproliferativa • Seletividade • Apoptose • Estresse oxidativo • Ciclo celular.

ABSTRACT

Selective antiproliferative activity against tumor cells is a highly desirable pharmacological property for the development of new therapeutic agents. This chapter aimed to evaluate *in vitro* the antiproliferative activity and mechanisms of action of the hydroalcoholic extracts of *Tithonia diversifolia*, characterized in Chapter 1, on the MCF-7 (breast carcinoma) and MCF-10A (non-tumor) cell lines. The extracts, from five locations in Espírito Santo (Colatina, Muniz Freire, Viana, UFES-Vitória, and Santa Teresa) and collected in 2014 and 2015, were subjected to a series of biological assays. Cytotoxicity and selectivity were initially assessed by the MTT assay, and the selective extracts (Selectivity Index - SI > 2.0) were subsequently investigated in proliferation (crystal violet) and clonogenicity assays. The mechanisms of action were elucidated through analyses of reactive oxygen species (ROS) production, cell cycle distribution, histone H2AX phosphorylation (γ -H2AX), and apoptosis (Annexin V/PI), using flow cytometry. The results demonstrated that the extracts exhibited concentration-dependent antiproliferative activity against MCF-7 cells. The MUF4 and MUF5 extracts from Muniz Freire stood out with the highest selectivity indices (SI > 2.2) and were selected for detailed investigation. These extracts significantly inhibited the proliferation and colony formation of MCF-7 cells. The underlying mechanisms involved the induction of a significant increase in ROS, cell cycle arrest (with accumulation in S and G2/M phases), and activation of apoptosis (up to 90% of cells). Notably, no induction of γ -H2AX was detected, indicating that cytotoxicity is not mediated by direct genotoxic DNA damage, but rather by oxidative stress and disruption of cellular homeostasis. It is concluded that the extracts of *T. diversifolia*, particularly those from Muniz Freire, possess selective and potent antiproliferative activity against breast cancer cells *in vitro*. Their mechanism of action involves the induction of oxidative stress, cell cycle arrest, and apoptosis, reinforcing the therapeutic potential of the species and the influence of geographical origin on its bioactivity.

Keywords: Antiproliferative activity • Selectivity • Apoptosis • Oxidative stress • Cell cycle.

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama representa um dos maiores desafios da saúde pública global, sendo a neoplasia mais comum e uma das principais causas de morte entre as mulheres. A partir disso, a busca por novas terapias, mais eficazes, menos invasivas e custosas é contínua. Nesse contexto, a bioprospecção de plantas medicinais surge como uma estratégia promissora, pois oferece uma ampla diversidade química de compostos bioativos com mecanismos de ação diversos e, frequentemente, com perfis de toxicidade mais favoráveis em comparação com agentes sintéticos (Atanasov *et al.*, 2021; Dutra *et al.*, 2016).

Diversos estudos demonstram que a família Asteraceae, à qual pertence *Tithonia diversifolia*, é uma fonte rica de metabólitos secundários, como lactonas sesquiterpênicas, flavonoides e compostos fenólicos, com atividade antiproliferativa comprovada em linhagens cancerígenas (Rolnik & Olas, 2021; Anantharaju *et al.*, 2016). A própria *T. diversifolia* tem sido tradicionalmente utilizada na medicina popular, e investigações científicas recentes corroboram seu potencial farmacológico, incluindo efeitos citotóxicos seletivos, como a indução de apoptose e a modulação do ciclo celular (Kato-Noguchi, 2020; Lu *et al.*, 2017; Lin *et al.*, 2022).

A atividade antiproliferativa de compostos naturais pode ocorrer por diferentes mecanismos celulares e moleculares, incluindo a interrupção do ciclo celular, a indução de estresse oxidativo, danos ao DNA e a ativação de vias de morte celular programada. Nesse contexto, ensaios de viabilidade celular, como o MTT, são amplamente utilizados como ferramentas iniciais para triagem de citotoxicidade, enquanto abordagens complementares permitem aprofundar a compreensão dos mecanismos de ação envolvidos. Marcadores como a fosforilação da histona H2AX (γ -H2AX) têm sido empregados na detecção de danos ao DNA, e a avaliação da apoptose é particularmente relevante por representar um alvo terapêutico desejável em estratégias antineoplásicas (Picot *et al.*, 2006; Gorrini *et al.*, 2013; Toyoda *et al.*, 2013; Girgin *et al.*, 2023).

Diante do exposto, e considerando a variabilidade química previamente demonstrada nos extratos de *T. diversifolia* provenientes de diferentes localidades (Capítulo 1), este capítulo tem como objetivo avaliar *in vitro* a atividade antiproliferativa e a citotoxicidade seletiva desses extratos sobre as linhagens celulares MCF-7 e MCF-10A. Adicionalmente, busca-se investigar os possíveis mecanismos de ação envolvidos, incluindo análise do ciclo celular, produção de EROS, indução de danos ao DNA (via γ -H2AX) e detecção de apoptose,

correlacionando essas atividades biológicas com a origem geográfica e fenologia do material vegetal.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Obtenção dos extratos

O material avaliado faz parte do Banco de Extratos do Laboratório de Genética de Plantas e Toxicológica da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Os extratos hidroalcoólicos de *Tithonia diversifolia* foram provenientes das folhas de plantas coletadas de cinco localidades do Espírito Santo: Colatina, Muniz Freire, Viana, Ufes-Vitória e Santa Teresa, nos estádios vegetativo e reprodutivo em 2014 e 2015 respectivamente. Os extratos foram produzidos nos mesmos anos das coletas e obtidos por meio de maceração à exaustão em etanol a 70%, protegido da luz em temperatura ambiente, etapa realizada pela Dr^a. Irany Rodrigues Pretti. Após a preparação, os extratos foram devidamente acondicionados em *freezer* (-20 °C), protegidos da incidência de luz e do calor, e mantidos em recipientes hermeticamente vedados, a fim de preservar sua estabilidade físico-química até a realização das análises experimentais.

2.2 Viabilidade celular

A atividade citotóxica dos extratos foi avaliada por meio do ensaio de viabilidade celular utilizando MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio brometo) conforme metodologia descrita por Dutra *et al.* (2018), com modificações. Para esse ensaio, foram empregadas as linhagens celulares MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano) e MCF-10A (epitélio mamário não tumoral), cultivadas em condições padronizadas. Para a avaliação da atividade antiproliferativa dos extratos vegetais foram selecionadas as concentrações de 500, 250, 125, 62,5 e 31,25 µg/mL. Foram selecionados dois tempos de exposição das células aos extratos, 48 e 72 h. As células foram semeadas em uma densidade de 5×10^3 em 100 µL e, para a manutenção da cultura foi utilizado o meio completo (DMEM *high glucose*, soro fetal bovino e antibiótico) e incubação das células por 24 h em incubadora umidificada a 37 °C e CO₂ a 5 %. O teste foi feito em uma microplaca de 96 poços. A solução MTT preparada e aplicada após completado os tempos de exposição ao extrato. Ao fim dos tratamentos foi

aplicada uma solução de DMSO (dimetilssulfóxido) para solubilizar o MTT, que é insolúvel em água. Após o período de tratamento com os extratos, a solução de MTT foi adicionada às placas e incubada, permitindo a formação de cristais de formazan pela ação das desidrogenases mitocondriais de células metabolicamente ativas. Os cristais foram solubilizados e a absorbância medida em espectrofotômetro, sendo os valores utilizados para o cálculo do IC₅₀ e índice de seletividade. Ao final do experimento, a reação foi lida em espectrofotômetro de placas da marca Multiskan™ FC Microplate Phostometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), com comprimento de onda em 570 nm e referência em 620nm. Todo o experimento foi conduzido em triplicata.

2.3 Proliferação celular

A partir deste ensaio, os experimentos biológicos foram realizados em parceria com a Universidade Federal do Paraná (UFPR) – Laboratório de (Eco)Toxicologia *In Vitro*/Mutagênese Ambiental). A avaliação da proliferação celular foi realizada por meio do ensaio colorimétrico de cristal violeta, baseado nas metodologias descritas por Bonnekoh *et al.* (1989) e Vega-Avila e Pugsley (2011), com adaptações. As células foram semeadas em placas de 96 poços (5×10^3 células/poço) e, após 24 h de adesão, tratadas com as concentrações 56,63 e 74,19 µg/mL dos extratos que apresentaram seletividade por 48 h no ensaio de MTT. Em seguida, foram fixadas com metanol, coradas com cristal violeta 0,5%, lavadas e o corante retido foi solubilizado em ácido acético 33%. Ao final do experimento, a reação foi lida em espectrofotômetro de placas da marca Multiskan™ FC Microplate Phostometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), com comprimento de onda em 570 nm e referência em 620nm. Todo o experimento foi conduzido em triplicata.

2.4 Ensaio clonogênico

O ensaio clonogênico foi realizado com o objetivo de avaliar a capacidade de formação de colônias da linhagem celular MCF-7 após exposição aos tratamentos, com adaptações do protocolo descrito por Boia-Ferreira *et al.* (2017). Para tanto, as células foram plaqueadas em placas de 6 poços na densidade de 1×10^3 células por poço e mantidas em incubadora por 24 h para permitir a fixação celular. Após esse período, as células foram tratadas com a concentração equivalente ao IC₅₀ previamente determinada no ensaio para a linhagem, permanecendo em incubação por 48h. Após o término do tratamento, o meio foi aspirado e

novamente preenchidos com meio de cultura, seguido de incubação. A cultura ocorreu durante 7 dias, até observar a formação de colônias e além disso, foi realizada com dois tipos de meios diferentes, o RPMI e o DMEM, ambos completos para testar o comportamento celular diante da formação de colônias em diferentes meios de exposição.

Posteriormente, o meio foi removido, as células lavadas com PBS e submetidas ao processo de fixação. A fixação foi realizada inicialmente com solução de paraformaldeído (PFA) a 4% por 10 min, seguida da adição de metanol a 2% por 10 min. Em seguida, procedeu-se à coloração com cristal violeta (CV) por 10 min. O excesso de corante foi descartado, e os poços lavados cuidadosamente com água ultrapura até a remoção total do excesso de CV. As placas foram fotografadas com o auxílio de uma lupa, e as imagens obtidas foram analisadas por meio do software ImageJ®, para quantificação da formação de colônias.

2.5 Ciclo celular e Espécies reativas de oxigênio (EROs)

A análise do ciclo celular e da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi realizada por citometria de fluxo, conforme metodologia descrita por Krishan (1975), com modificações. As células MCF-7 foram cultivadas e tratadas com os extratos por 24h e 48h. Para a avaliação do ciclo celular, as células foram coletadas, lavadas com PBS e fixadas em etanol 70% gelado, permanecendo a 4 °C por no mínimo 2h. Em seguida, foram incubadas com RNase A (50 µg/mL) e coradas com iodeto de propídio (PI, 50 µg/mL). A fluorescência foi adquirida em citômetro de fluxo, e a distribuição das células nas fases G0/G1, S e G2/M foi determinada por análise dos histogramas de fluorescência utilizando o software FlowJo (BD Biosciences).

Para a quantificação de EROs intracelulares, após o tratamento os poços foram incubados com o corante fluorescente DCFH-DA (10 µM) por 30 min a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Após as lavagens com PBS, as células foram imediatamente analisadas em citômetro de fluxo (BD FACSVersé, em parceria com a Universidade Federal do Paraná – Laboratório de (Eco)Toxicologia *In Vitro*/Mutagênese Ambiental), e os resultados expressos como intensidade média de fluorescência relativa ao controle.

2.6 Ensaio de Fosforilação da Histona H2A.X

A detecção da fosforilação da histona H2A.X foi realizada utilizando o kit FlowCelect™ Histone H2A.X Phosphorylation Assay (MilliporeSigma), de acordo com as instruções do fabricante, com adaptações para as condições do estudo. As células foram plaqueadas em placas de 6 poços na densidade necessária para atingir confluência de 100%, incubadas a 37 °C, 5% de CO₂ e atmosfera umidificada. Após 24h de estabilização, foram expostas ao extrato etanólico de *Tithonia diversifolia* nas concentrações que demonstraram seletividade pelos períodos de 4h e 24h. O peróxido de hidrogênio (H₂O₂, 600 µM, 1 h) foi utilizado como controle positivo para as células MCF-7.

Ao término das exposições, as células foram coletadas por tripsinização, lavadas e fixadas com *Fixation Buffer*, conforme protocolo do kit. Em seguida, procedeu-se à permeabilização celular com *Permeabilization Buffer* e posterior incubação com o anticorpo anti-Histone H2A.X conjugado ao fluoróforo Alexa Fluor™ 488 (1:100). Para contra-coloração do DNA, foi utilizado iodeto de propídio (PI, 1 µg/mL), exceto nos controles negativos.

As amostras foram mantidas protegidas da luz até a análise, realizada imediatamente em citômetro de fluxo (BD FACS Verse™, em parceria com a Universidade Federal do Paraná – Laboratório de (Eco)Toxicologia *In Vitro*/Mutagênese Ambiental).

2.7 Anexina

A avaliação dos diferentes estágios de morte celular foi realizada por meio do ensaio de marcação com Anexina V-FITC e Iodeto de Propídio (PI), de acordo com as instruções do kit comercial Metabolic Activity Dead Cell Apoptosis Kit with C12 Resazurin, Annexin V APC & SYTOX™ Green for Flow Cytometry. Após 24 horas com os respectivos tratamentos dos extratos que demonstraram seletivos, foram coletadas por tripsinização suave, lavadas duas vezes com tampão PBS frio (pH 7,4) e ressuspensas em tampão de ligação (Binding Buffer, fornecido pelo kit).

Para cada amostra, 100 µL da suspensão celular foram incubados com 5 µL de Anexina V-FITC e 5 µL de PI (50 µg/mL), durante 15 minutos em temperatura ambiente, protegidas da luz. Após este período, foram adicionados 400 µL de tampão de ligação e as amostras imediatamente submetidas à análise por citometria de fluxo BD FACS Verse™.

A aquisição foi realizada coletando-se, no mínimo, 10.000 eventos por amostra. Os canais FL1 e FL2/FL3 foram utilizados para detecção da fluorescência da Anexina V-FITC (530

nm) e do PI (620 nm), respectivamente. A análise dos dados foi conduzida no software FlowJo, com estabelecimento de quadrantes para discriminação das populações celulares: células viáveis (Anexina V-/PI-), células em apoptose inicial (Anexina V+/PI-), apoptose tardia (Anexina V+/PI+) e necrose (Anexina V-/PI+).

2.8 Análise Estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata independente ($n = 3$). Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP). As comparações entre grupos foram realizadas por análise de variância (ANOVA), seguida de teste pós-hoc de Dunnett, quando comparados com o controle negativo. Para comparações pareadas entre dois grupos específicos, utilizou-se o teste t de Student. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. Todas as análises foram conduzidas no software GraphPad Prism versão 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Viabilidade celular

A atividade citotóxica dos extratos foi avaliada por meio do ensaio de MTT em células MCF-7 (tumerais) e MCF-10A (não tumerais) em 48 e 72 horas de todas as cinco localidades: Colatina, Muniz Freire, UFES, Santa Teresa e Viana, além disso, foi avaliado nos dois anos de coleta, 2014 e 2015, assim como demonstrado na figura 10.

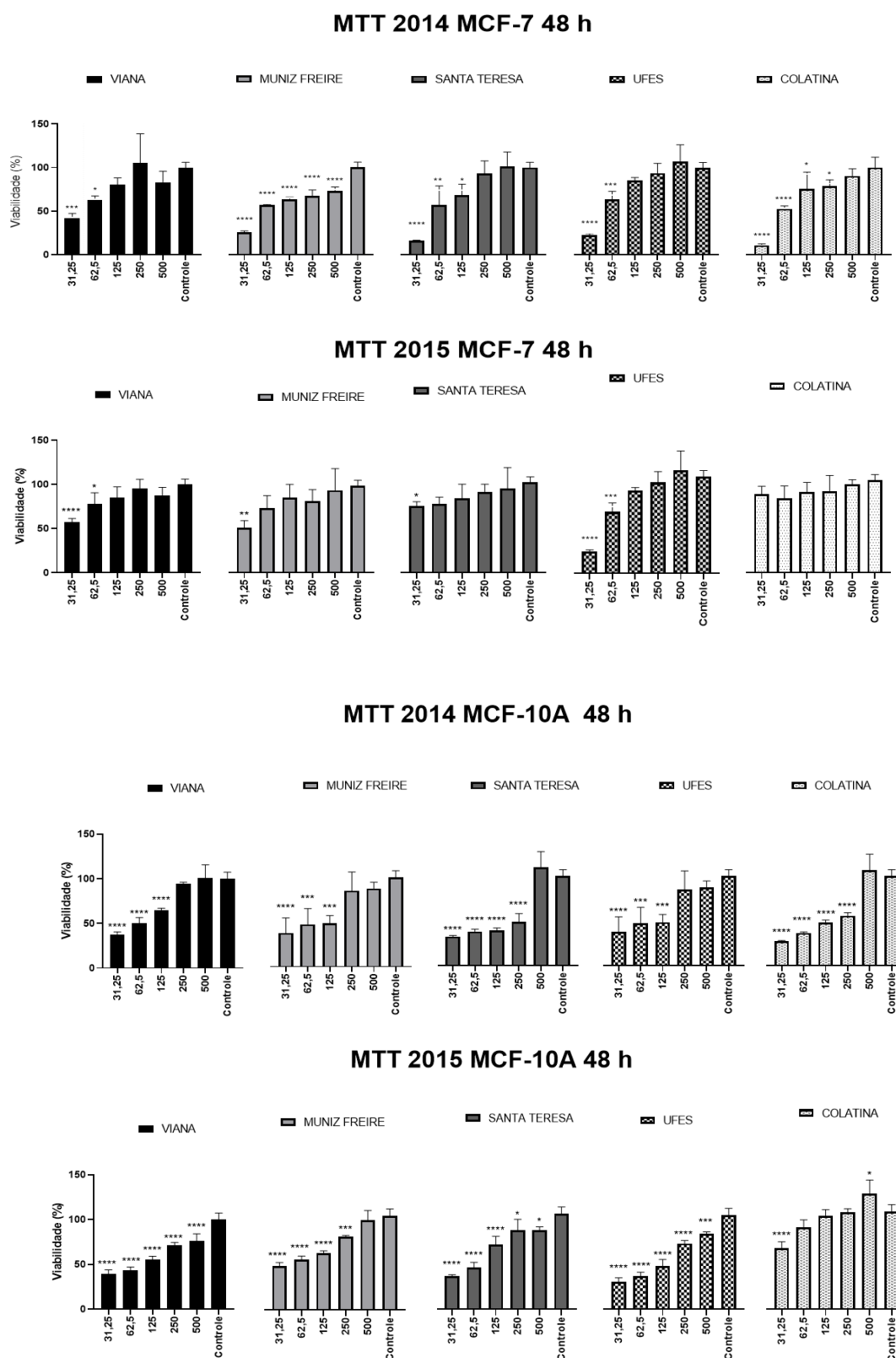


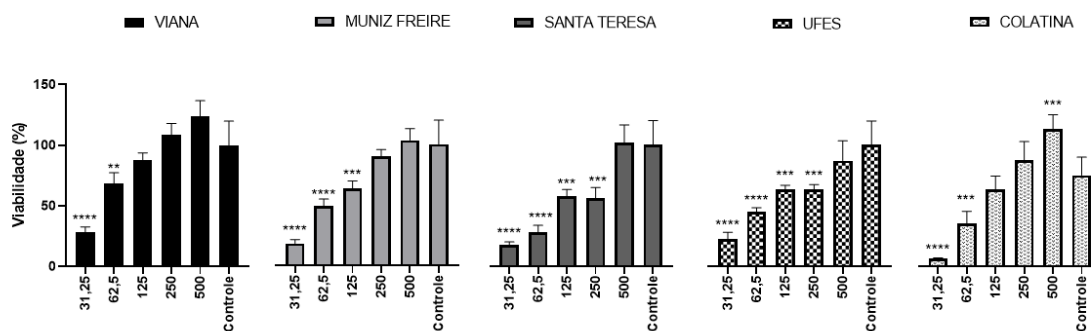
Figura 10: Gráficos de viabilidade celular obtidos após 48 horas de exposição ao extrato hidroalcoólico de *Tithonia diversifolia* em diferentes concentrações, avaliando-se as linhagens MCF-7 e MCF-10A, para as coletas realizadas nos anos de 2014 e 2015. O asterisco (*) indica diferença estatisticamente significativa.

A partir da comparação dos ensaios de viabilidade celular (MTT), observou-se que os extratos de *Tithonia diversifolia* apresentaram atividade antiproliferativa seletiva e concentração-dependente contra as células de câncer de mama MCF-7. De maneira geral, nas menores concentrações avaliadas, verificou-se uma redução significativa da viabilidade celular em todas as localidades, tanto para MCF-7 quanto para MCF-10A, com exceção das amostras provenientes de Santa Teresa e Colatina no ano de 2014 (MCF-7, 48h).

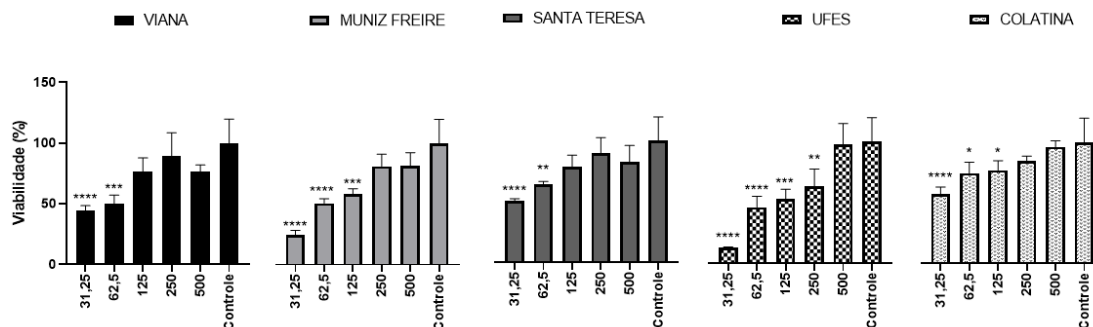
Esse comportamento relaciona o conceito de resposta concentração-dependente, no qual existe uma relação direta entre o aumento da concentração de uma substância e a intensidade do efeito biológico produzido, ou seja, conforme a concentração do extrato aumenta, a resposta celular tende a se intensificar, geralmente de forma proporcional.

Esse perfil é observado também na figura 11, em até aproximadamente 125 µg/mL e 250µg/mL, a partir disso, a relação deixa de seguir o padrão esperado, possivelmente devido à saturação dos mecanismos de transporte celular.

MTT 2014 MCF-7 72 h



MTT 2015 MCF-7 72 h



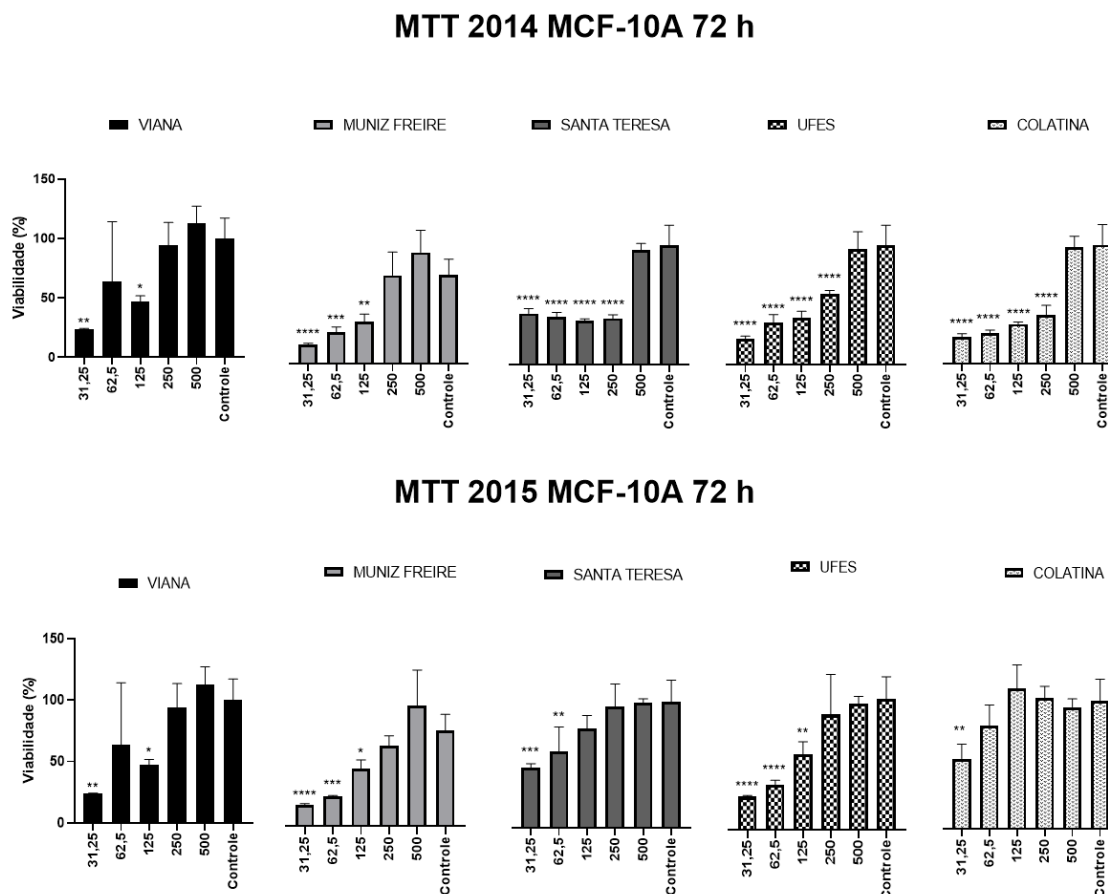


Figura 11: Gráficos de viabilidade celular obtidos após 72 horas de exposição ao extrato hidroalcoólico de *Tithonia diversifolia* em diferentes concentrações, avaliando-se as linhagens MCF-7 e MCF-10A, para as coletas realizadas nos anos de 2014 e 2015. O asterisco (*) indica diferença estatisticamente significativa.

Dessa maneira, muitas moléculas bioativas dependem de transportadores específicos ou de processos de difusão facilitada para atravessar a membrana plasmática, entretanto, esses sistemas possuem capacidade limitada. Quando os transportadores atingem seu limite máximo de fluxo, o aumento da concentração extracelular deixa de resultar em maior entrada do composto, fenômeno semelhante ao observado em processos farmacocinéticos de absorção e transporte.

Assim, após a saturação, a célula pode acionar mecanismos de defesa e sobrevivência, como redução do influxo, aumento do efluxo ou ativação de rotas metabólicas compensatórias, o que explica a perda da proporcionalidade entre dose e efeito antiproliferativo nas concentrações mais elevadas.

Na figura 12 são apresentados os resultados do ensaio de MTT referente a 2024 para as localidades de Santa Teresa e UFES de 48h e 72h, permitindo a comparação direta com as amostras analisadas nos anos anteriores.

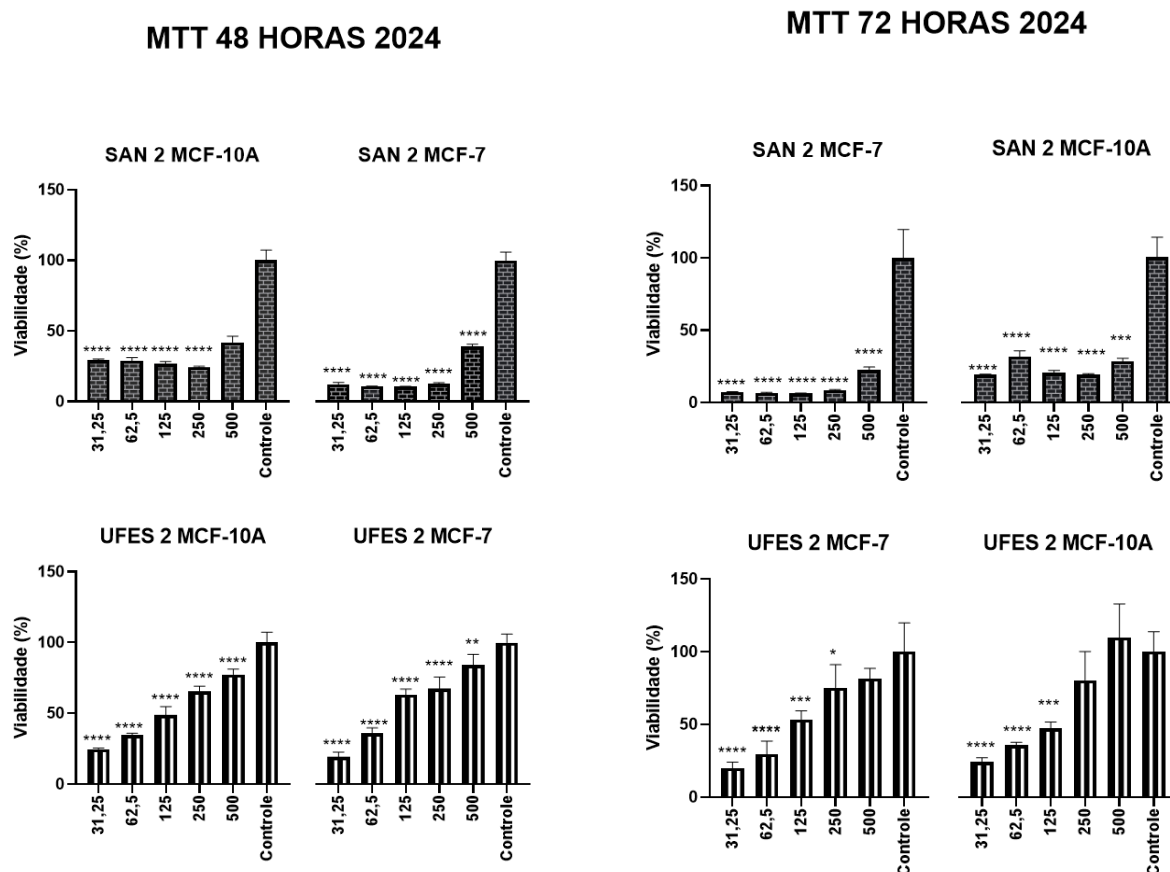


Figura 12: Gráficos de viabilidade celular obtidos após 48 e 72 horas de exposição ao extrato hidroalcoólico de *Tithonia diversifolia* em diferentes concentrações, avaliando-se as linhagens MCF-7 e MCF-10A, para as coletas realizadas nos anos de 2024. O asterisco (*) indica diferença estatisticamente significativa.

A partir dos resultados de viabilidade celular para o ano de 2024 de duas localidades, Santa Teresa e Ufes, observa-se que o comportamento concentração-dependente permanece evidente para ambas as localidades, preferencialmente em até cerca de 125 µg/mL, confirmando o comportamento descrito de redução da viabilidade conforme o aumento da concentração do extrato.

Já na localidade Santa Teresa, os extratos de 2024 continuam demonstrando forte atividade antiproliferativa, sobretudo em MCF-7, com reduções expressivas de viabilidade já nas menores concentrações (31,25–125 µg/mL). Esse comportamento pode ser explicado a partir dos resultados da análise química do extrato apresentados no Capítulo 1 deste trabalho, na qual revelou a presença de polióis, álcoois e fenóis, grupos associados à estabilização de

metabólitos e descritos na literatura por desempenharem papel em processos redutores e de interação molecular (Dada *et al.*, 2018).

Para a linhagem MCF-10A, em Santa Teresa, observa-se um perfil semelhante ao de 2015, com redução moderada da viabilidade, porém menos acentuada que na MCF-7, o que sugere uma tendência à seletividade antiproliferativa, característica desejável para potenciais agentes terapêuticos.

Na localidade UFES, o comportamento dose-resposta em 2024 também acompanha o perfil observado nos anos anteriores, com queda significativa da viabilidade de MCF-7 nas menores concentrações. Contudo, quando comparado a 2014 e 2015, o extrato de 2024 demonstra uma resposta mais equilibrada entre MCF-7 e MCF-10A, sugerindo uma distribuição dos compostos bioativos ou potencial alteração no perfil metabólico da planta. Assim como registrado nas análises FTIR e no estudo ESI-TOF da UFES tende a apresentar menor variabilidade química entre os anos, o que é coerente com o padrão mais estável de viabilidade celular encontrado.

Outro ponto relevante é que, assim como observado nos anos anteriores, a partir de aproximadamente 250–500 $\mu\text{g/mL}$ o padrão claramente concentração-dependente se reduz, sugerindo a hipótese de saturação dos mecanismos de transporte celular ou ativação de rotas compensatórias de sobrevivência, fenômeno discutido previamente no texto e coerente com modelos clássicos de dinâmica farmacológica.

Vale acrescentar que a partir do ensaio de viabilidade celular, pode ser calculado os valores de IC_{50} e conseqüentemente os índices de seletividade (IS), assim como demonstrado nas tabelas 6 e 7.

Tabela 6: Valores de IC₅₀ (µg/mL) determinados pelo ensaio de MTT em células MCF-10A (normais) e MCF-7 (câncer de mama) após 48h de exposição aos extratos, e respectivos Índices de Seletividade (IS). Foram considerados seletivos os extratos com IS > 2,0. Fonte: Autoria própria.

Amostra	IC ₅₀ MCF-10A (µg/mL)	IC ₅₀ MCF-7 (µg/mL)	Índice de seletividade (IS)
COL4	247,9	180,3	1,37
COL5	110,1	146,7	0,75
VIA4	123,4	99,27	1,24
VIA5	131,6	69,32	1,9
MUF4	144,4	56,63	2,55
MUF5	165,9	74,19	2,23
SANT4	288,7	191,3	1,51
SANT5	83,89	95,04	0,88
SANT24	353,2	268	1,32
UFES4	104,3	74,64	1,39
UFES5	144,2	78,02	1,85
UFES2	127,6	103,1	1,24

Tabela 7: Valores de IC₅₀ (µg/mL) determinados pelo ensaio de MTT em células MCF-10A (normais) e MCF-7 (câncer de mama) após 72 h de exposição aos extratos, e respectivos Índices de Seletividade (IS). Foram considerados seletivos os extratos com IS > 2,0. Fonte: Autoria própria.

Amostra	IC ₅₀ MCF-10A (µg/mL)	IC ₅₀ MCF-7 (µg/mL)	Índice de seletividade (IS)
COL4	289,9	229,1	1,26
COL5	63	111,1	0,56
VIA4	134,3	90,84	1,47
VIA5	146,5	100,5	1,45
MUF4	172,9	103,6	1,66
MUF5	178,5	84,81	2,1
SANT4	274,4	217	1,26
SANT5	101,6	116,2	0,87
SANT24	283,7	262,9	1,07
UFES4	213,3	108,3	1,96
UFES5	130,8	129,3	1,01
UFES2	182,2	117	1,55

Assim como no artigo de Burggraaff *et al.* (2020), o cálculo do IS a partir dos dados experimentais de IC₅₀ fornece uma medida quantitativa e interpretável da seletividade. Dessa

forma, foi calculado como a razão entre o IC_{50} nas células não tumorais MCF-10A e o IC_{50} nas células tumorais MCF-7, conforme abordagem amplamente utilizada em triagem farmacológica para quantificar a preferência de um composto por um determinado tipo celular.

$$IS = \frac{IC_{50} (\text{célula normal, MCF} - 10A)}{IC_{50} (\text{célula cancerígena, MCF} - 7)}$$

Os valores de $IS \geq 2,0$ foram considerados indicativos de seletividade contra as células cancerosas, critério semelhante ao utilizado em estudos de modelagem computacional de seletividade entre alvos moleculares, nos quais diferenças de 100 vezes (equivalente a 2 unidades logarítmicas) são frequentemente adotadas como limiar de seletividade sendo uma ferramenta válida para triagem de extratos com potencial terapêutico.

De acordo com a tabela 6, após 48 horas de exposição, dois extratos destacaram-se pelo perfil seletivo acentuado: MUF4 ($IS = 2,55$) e MUF5 ($IS = 2,23$). Os extratos MUF4 e MUF5 demonstraram perfil seletivo acentuado contra células MCF-7, sugerindo mecanismos de ação preferenciais em células tumorais. Estudos recentes com peptídeos formadores de canais iônicos, como a Gramicidina A, mostram que compostos que atuam na despolarização de membranas e na disfunção mitocondrial podem explorar diferenças metabólicas e bioenergéticas entre células normais e cancerosas (Xue *et al.*, 2022).

A busca por agentes com citotoxicidade seletiva contra células tumorais é fundamental no desenvolvimento de terapias mais seguras, alinhando-se com os avanços contemporâneos em sistemas de liberação controlada e medicina regenerativa, que priorizam a precisão e a minimização de danos a tecidos saudáveis (Rasekh *et al.*, 2025). Neste contexto, a avaliação do Índice de Seletividade (IS) de extratos vegetais surge como uma estratégia de triagem, a partir dos resultados indicados pelos extratos VIA5 ($IS = 1,90$) e UFES5 ($IS = 1,85$) na qual apresentam uma tendência à seletividade. Embora não tenham atingido o critério estabelecido ($IS \geq 2$), este perfil farmacológico sugere que ajustes na formulação ou no perfil de liberação, assim como indicado por Rasekh *et al.* (2025), de modo que potencialmente otimize seu perfil seletivo, transformando-os em candidatos viáveis para estudos de entrega direcionada. Contudo, VIA4 ($IS = 1,24$), UFES4 ($IS = 1,39$) e UFES2 ($IS = 1,24$) mostraram

apenas moderada diferenciação, com índices próximos à unidade, indicando toxicidade similar em ambas as linhagens.

Uma evidência relevante, refere-se aos extratos COL5 (IS = 0,75) e SANT5 (IS = 0,88), que apresentaram $IS < 1,0$. Esse resultado pode indicar que as amostras apresentam maior toxicidade para células normais do que para células cancerosas, evidenciando a necessidade de estratégias que aprimorem a seletividade. Nesse contexto, devem ser investigados diferentes métodos de extração, variações de solventes e, eventualmente, o isolamento de compostos, com o objetivo de viabilizar essas amostras como potenciais agentes terapêuticos.

Em vista de toda a discussão supracitada, os resultados do ensaio de MTT, associados aos índices de seletividade, evidenciam que apenas um conjunto limitado de extratos de *Tithonia diversifolia* apresentou real potencial antiproliferativo com segurança biológica, destacando-se MUF4 e MUF5, que demonstraram seletividade em 48 e 72 horas. Esses extratos exibiram maior citotoxicidade para as células MCF-7 em comparação às MCF-10A, indicando preferência de ação sobre células tumorais, ao contrário de amostras como COL5 e SANT5, que se mostraram mais tóxicas para células normais. De modo geral, os dados reforçam que o potencial bioativo da espécie é altamente dependente da localidade e do perfil metabólico específico de cada extrato.

3.2 Proliferação celular

O ensaio colorimétrico de proliferação celular foi realizado com Cristal Violeta (CV) exclusivamente em células MCF-7 e tratadas apenas com os extratos de MUF4 e MUF5, uma vez que demonstraram maiores índices de seletividade apresentados anteriormente. Dessa forma, a partir da observação da figura 13 é possível notar que os extratos MUF4 e MUF5 promoveram redução da proliferação celular após 24 horas, sendo o efeito mais significativo para o extrato MUF4.

Esses resultados demonstram que ambos os extratos foram capazes de inibir a proliferação de células tumorais, mas apenas MUF5 apresentou seletividade frente às células não tumorais, indicando maior potencial para investigação em estudos posteriores.

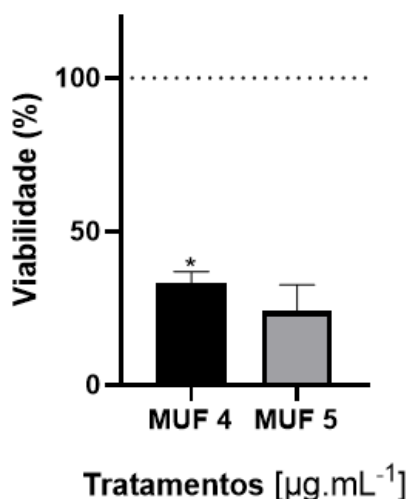


Figura 13: Efeito dos extratos MUF4 e MUF5 sobre a proliferação de células MCF-7 no ensaio de cristal violeta após 24 h de tratamento. Os valores representam a média \pm DP de três experimentos independentes. O asterisco (*) indica diferença estatisticamente significativa.

A partir da imagem acima, pode-se observar um efeito significativo para o extrato MUF4, sugerindo que a atividade antiproliferativa pode estar associada à presença combinada de flavonoides, lactonas sesquiterpênicas e ácidos hidroxicinâmicos, classes amplamente descritas na família Asteraceae (ROLNIK; OLAS, 2021; ARAÚJO *et al.*, 2021), as quais são reconhecidas por atuarem como moduladoras da progressão do ciclo celular e por desencadearem mecanismos de apoptose em células tumorais que serão esclarecidos a partir de outros ensaios.

Em síntese, o ensaio de CV evidencia que MUF4 exerce o efeito antiproliferativo mais pronunciado sobre as células MCF-7, enquanto MUF5 mantém a vantagem previamente observada em termos de seletividade. A associação dessas contribuições com o perfil químico fortalece a hipótese de que a combinação de metabólitos presentes atua de maneira integrada na proliferação celular.

3.3 Ensaio clonogênico

Para avaliar o efeito dos tratamentos MUF4 e MUF5 na capacidade de proliferação e sobrevivência celular a longo prazo, foi realizado um ensaio de formação de colônias. Os resultados ilustrados na figura 14, revelam que em ambos os meios de cultura, os tratamentos MUF4 e MUF5 reduziram significativamente a capacidade de formação de colônias das células quando comparados ao grupo controle (CN, $p < 0,05$).

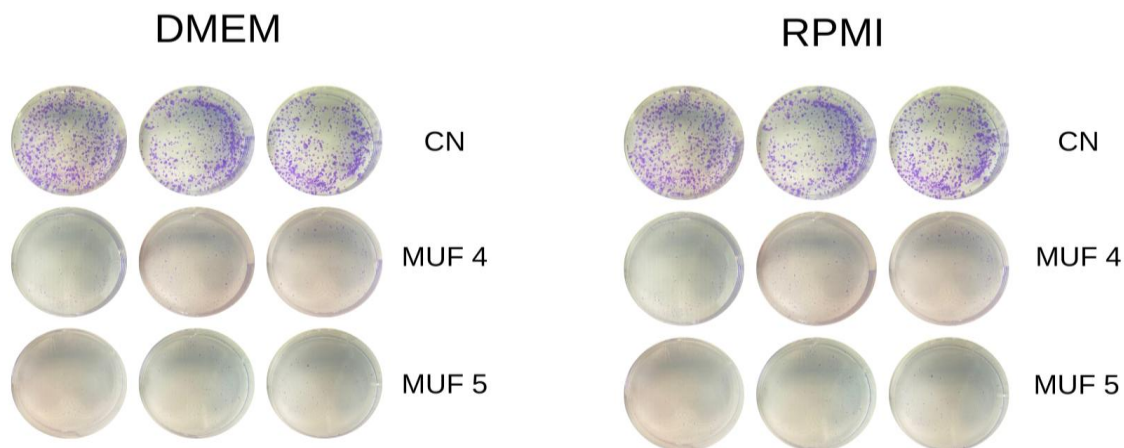


Figura 14: Avaliação do potencial clonogênico de células MCF-7 cultivadas em DMEM e RPMI após tratamento com os extratos de MUF4 e MUF5. Fonte: Autoria própria.

No meio DMEM, observou-se uma formação de colônias no grupo CN com uma média de aproximadamente 350 colônias. Em contraste, os grupos tratados com MUF4 e MUF5 exibiram uma drástica redução na formação de colônias, atingindo cerca de 80 e 60 colônias, respectivamente, assim como demonstrado na figura 15. Essa redução representa uma inibição de aproximadamente 77% e 83% para MUF4 e MUF5, respectivamente.

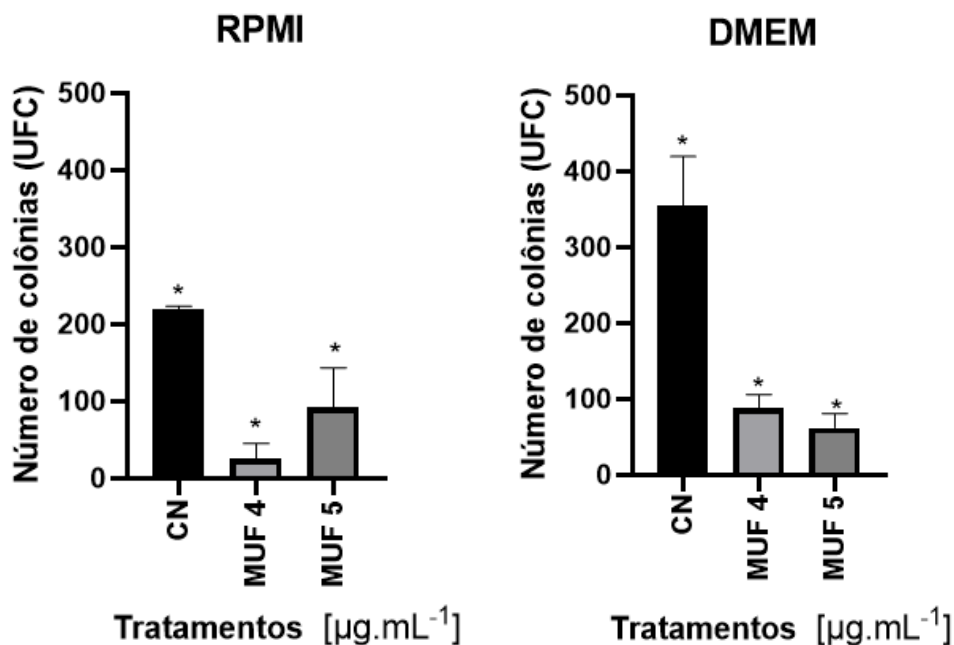


Figura 15: Número de colônias formadas pela linhagem MCF-7 após os tratamentos nos meios DMEM e RPMI. Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão. CN: controle negativo; MUF4 e MUF5: tratamentos testados. * $p < 0,05$ em relação ao controle. O asterisco (*) indica diferença estatisticamente significativa.

Enquanto no meio RPMI, o grupo controle manteve uma alta formação clonogênica, formando cerca de 215 colônias. No entanto, na presença dos compostos MUF 4 e MUF 5 suprimiu este potencial, o tratamento MUF4 foi particularmente efetivo neste meio, reduzindo o número de colônias para aproximadamente 25 colônias, enquanto MUF reduziu para cerca de 90, respectivamente.

A redução no número de colônias formadas sob tratamento com MUF4 e MUF5 em ambos os meios utilizados, sugere que esses compostos podem estar interferindo na dinâmica do citoesqueleto ou em vias de sinalização de sobrevivência celular, mecanismos semelhantes aos descritos para extratos vegetais com atividade anti-clonogênica, como o extrato de *Vincetoxicum amotitanum* (Adamus *et al.*, 2021).

Em conjunto, estes dados indicam que ambos os tratamentos possuem um efeito anti-clonogênico, comprometendo a capacidade proliferativa das células. É notável que o perfil de inibição variou entre os meios, sugerindo uma possível interação entre o microambiente nutricional e a eficácia dos tratamentos. O composto MUF4 demonstrou consistentemente o efeito inibitório mais pronunciado em ambas as condições de cultivo, destacando-se como o agente potente na supressão da formação de colônias.

3.4 Ciclo celular e EROs

A análise dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) revelou que os extratos MUF4 e MUF5 induzem um aumento do estresse oxidativo em células MCF-7, com elevação significativa da intensidade média de fluorescência (MFI) já nas primeiras 24h de exposição, efeito que se mantém até 48h (figura 16).

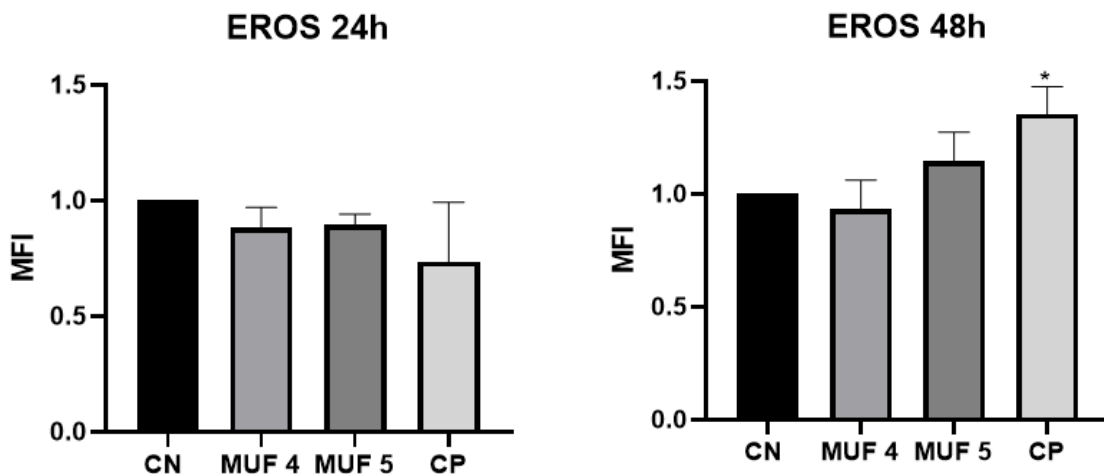


Figura 16: Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em células MCF-7 tratadas com os extratos de *Tithonia diversifolia* (MUF4; MUF5) por 24h e 48h. Os resultados estão expressos como intensidade média de fluorescência (MFI). Dados expressos como média \pm DP. O asterisco (*) indica diferença estatisticamente significativa.

Esse perfil oxidativo coincide com o alto índice de seletividade apresentado no ensaio de MTT ($IS > 2,2$) observado para ambos os extratos, sugerindo uma sensibilidade que as células tumorais ao estresse oxidativo, o que pode indicar ser um mecanismo de sua ação citotóxica. As células cancerosas, como as linhagens de mama MCF-7, frequentemente apresentam defesas antioxidantes desreguladas e maior dependência de vias metabólicas geradoras de EROs, tornando-as mais sensíveis a agentes pró-oxidantes.

Como destacado por Kopustinskiene *et al.* (2020), os flavonoides possuem uma ação dual na homeostase das espécies reativas de oxigênio (EROs), atuando como antioxidantes em condições fisiológicas, mas como potentes pró-oxidantes em células tumorais, promovendo a ativação de vias apoptóticas e a regulação negativa de vias de sinalização pró-inflamatórias. Esse fenômeno é compatível com mecanismos descritos para outros agentes antitumorais que atuam sobre a função mitocondrial, a qual, ao despolarizar a membrana mitocondrial interna e comprometer a síntese de ATP, pode desencadear secundariamente a produção de ROS e desequilíbrios bioenergéticos seletivamente citotóxicos para células tumorais (Xue *et al.*, 2022). Portanto, os dados indicam que a atividade seletiva de MUF 4 e MUF 5 pode estar associada à sua capacidade de induzir estresse oxidativo sustentado, explorando uma fraqueza metabólica característica das células cancerosas.

A exposição das células MCF-7 aos extratos de *Tithonia diversifolia* provenientes de Muniz Freire (MUF4 e MUF5) não promoveu aumento significativo de EROs em 24h, e, em 48h,

os níveis permaneceram próximos ao controle negativo, em contraste com o controle positivo, que exibiu um aumento significativo de MFI.

Em paralelo, ambos os extratos induziram uma redistribuição do ciclo celular, caracterizado por acúmulo em S-fase já em 24h e mantido em 48h, com o desaparecimento da fração G1/G0 e, no caso de MUF5, aumento adicional da fração G2/M (figura 17).

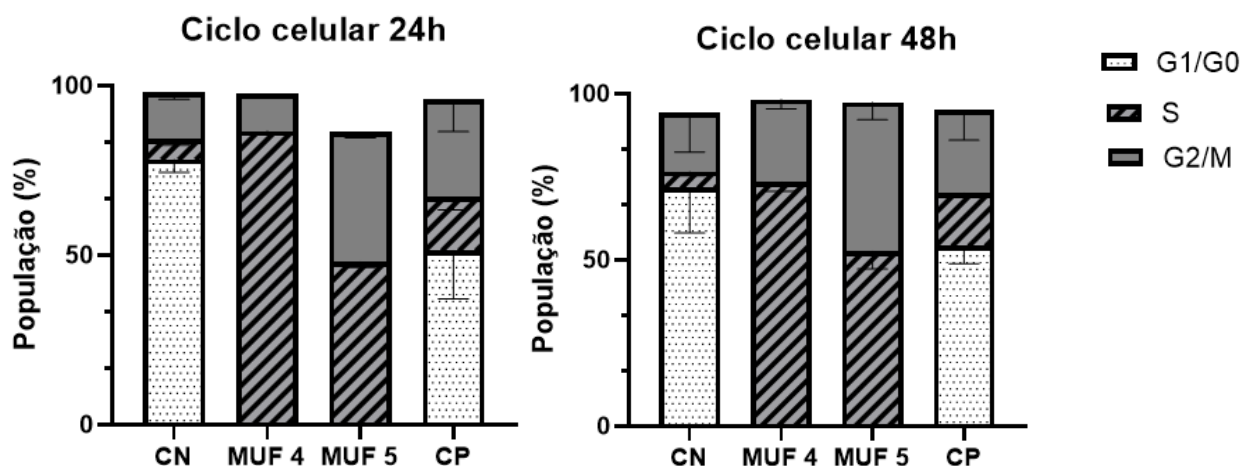


Figura 17: Distribuição do ciclo celular de células MCF-7 após tratamento com os extratos de *Tithonia diversifolia* (MUF e MUF5) por 24h e 48h, analisada por citometria de fluxo.

Os perfis de distribuição do ciclo celular revelaram que os extratos MUF4 e MUF5 induzem alterações distintas e tempo-dependentes na progressão proliferativa de células MCF-7. Em 24h, ambos os extratos promoveram um aumento significativo da população em fase S, com o desaparecimento da porção em G₁/G₀. Esse padrão se intensificou em 48h, de modo que a fase G₁/G₀ mantivesse desaparecida e à manutenção do acúmulo de células na fase S. Por outro lado, o MUF5 mostrou uma transição para um bloqueio predominante em G₂/M às 48h, sugerindo um mecanismo de ação diferenciado e possivelmente sequencial.

De acordo com Wang *et al.* (2018), flavonoides podem modular o ciclo celular em múltiplos pontos de checagem, dependendo de suas características químicas estruturais. O bloqueio em fase S observado com MUF4 e, inicialmente, com MUF5, é consistente com a ação de flavonoides que interferem na síntese de DNA ou ativam checkpoints intra-S em resposta a danos oxidativos ou estresse replicativo. Estruturas como a dupla ligação C₂=C₃ e a presença de grupos catecol (3',4'-di-hidroxila) no anel B, comuns em outros flavonoides como a

quercetina e a luteolina, e estão associadas à inibição de enzimas chave da replicação, como DNA polimerases e topoisomerases (Haddad *et al.*, 2006; Rauf *et al.*, 2018).

Já a parada em G₂/M promovido por MUF5 em 48h sugere a ativação de checkpoints de dano ao DNA não reparado, possivelmente mediada por flavonoides com substituições metoxiladas. Wang *et al.* (2018) destacam que a O-metilação aumenta a lipofilicidade e a estabilidade metabólica de flavonoides, permitindo maior acumulação intracelular e interação prolongada com alvos como a ciclina B e a quinase CDK1, críticas para a entrada em mitose. Dessa forma, esse perfil é observado em flavonoides como a nobiletina e a tangeretina, que frequentemente induzem parada em G₂/M (Wang *et al.*, 2018), sendo assim esse mecanismo não é exclusivo de flavonoides, uma vez que compostos de outras classes, como a tagitinin C (uma lactona sesquiterpênica), também induzem bloqueio em G₂/M através da inibição da survivina e ativação de Chk2 (Liao *et al.*, 2011), evidenciando a convergência de vias antiproliferativas entre diferentes fitoquímicos.

A redução drástica ou desaparecimento da fração G₁/G₀ indica que as células tratadas não retornam ao estado de quiescência, sendo retidas em fases de verificação de danos (S ou G₂/M). Esse comportamento é característico de agentes que induzem estresse genotóxico ou desregulação metabólica, impedindo a progressão normal do ciclo. Além disso, a seletividade observada (IS > 2,2) pode ser explicada pela maior sensibilidade de células tumorais a bloqueios do ciclo mediados por estresse oxidativo, uma vez que frequentemente apresentam defesas antioxidantes deficientes e dependência de vias proliferativas contínuas (Gorrini *et al.*, 2013; Prasad *et al.*, 2017)

Em conjunto, os resultados sugerem que MUF4 e MUF5 atuam por mecanismos complementares, possivelmente refletindo diferenças na composição de flavonoides ou na cinética de ação. Essas contribuições reforçam o potencial de extratos naturais ricos em flavonoides como moduladores de genes do ciclo celular, cujos efeitos dependem da estrutura química dos compostos e do tempo de exposição, contribuindo para o aumento das perspectivas e o desenvolvimento de fitoterápicos com mecanismos de ação sinérgicos e seletivos.

3.5 Ensaio de Fosforilação da Histona H2A.X

A fosforilação da histona H2A.X foi avaliada após 4h e 24h de exposição aos tratamentos utilizando-se a intensidade média de fluorescência (MFI) como parâmetro, assim como na figura 18.

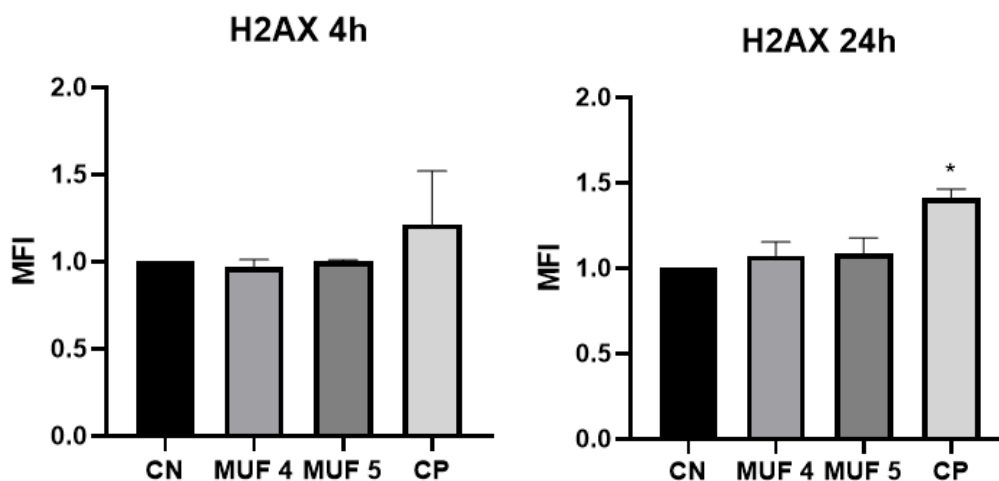


Figura 18: Intensidade média de fluorescência (MFI) da fosforilação da histona H2A.X em células MCF-7 expostas aos compostos MUF4 e MUF5 por 4h e 24h. Os valores representam média \pm DP de três experimentos independentes. O asterisco (*) indica diferença estatisticamente significativa.

O ensaio de fosforilação H2AX (γ H2AX) revelou um aspecto crucial do mecanismo de ação dos extratos MUF4 e MUF5. Diferente do controle positivo (H_2O_2), que induziu um aumento esperado e significativo neste marcador de quebras de fita dupla (DSBs), nenhum dos extratos promoveu aumento detectável de γ H2AX após 4h ou 24h de tratamento.

Este resultado indica que a atividade antiproliferativa e citotóxica observada não é primariamente mediada pela indução direta de danos genotóxicos graves no DNA, como DSBs. Em vez disso, ele direciona a interpretação para outras consequências celulares do estresse oxidativo (aumento de EROs) que foi consistentemente medido.

Baseado nos dados anteriores, possíveis hipóteses para esses resultados seriam: (i) Estresse oxidativo sem DSBs, (ii) Ativação de checkpoints por vias alternativas e (iii) Morte celular por estresse ou via alternativa.

Assim como já descrito, os extratos elevaram os níveis de EROs de modo que causasse estresse metabólico e oxidação de proteínas/lipídios, mas não ao extremo necessário para romper diretamente a dupla fita do DNA em grande quantidade. Uma possibilidade é que as EROs podem estar causando outros danos no DNA (como quebras de fita simples ou bases oxidadas) não detectáveis por γ H2AX, ou atuando principalmente em outros alvos celulares. Essa interpretação foi observada no estudo de Bekeschus *et al.* (2019), que demonstrou que a fosforilação de γ H2AX observada não era decorrente de dano direto ao DNA, mas sim da ativação de vias apoptóticas e de estresse oxidativo. Os autores observaram que, embora o tratamento com EROs induzisse γ H2AX, não houve aumento correspondente na formação de micronúcleos (marcador de genotoxicidade), além de não causarem quebras de dupla fita estáveis ou mutagenicidade duradoura. O estudo reforça que γ H2AX pode surgir como consequência de apoptose e sinalização redox, devendo ser interpretada com cautela em contextos de estresse oxidativo.

O desequilíbrio redox e o estresse metabólico induzidos pelos extratos podem ativar vias de sinalização de estresse e pontos de checagem do ciclo celular de forma independente da formação de quebras de dupla fita. Evidências indicam que as EROs são capazes de ativar diretamente a via p38 MAPK e a quinase ATM por meio de modificações redox em resíduos de cisteína, mesmo na ausência de dano direto ao DNA (Richardson *et al.*, 2015). Essa ativação desencadeia uma cascata de sinalização que converge na inibição de ciclinas e CDKs, resultando em parada do ciclo celular, senescência e apoptose, onde EROs elevados promovem perda de quiescência e diferenciação mieloide sem a necessidade de lesões genotóxicas diretas (Richardson *et al.*, 2015). Assim, o estresse oxidativo pode modular a progressão celular por meio de vias de sinalização redox-sensíveis, sem depender necessariamente de danos no DNA detectáveis por marcadores como γ H2AX.

Por fim, uma possível hipótese é a morte celular por estresse ou via alternativa, no qual a falha em restabelecer a homeostase frente a esse estresse prolongado (oxidativo e metabólico) leva à morte celular. Dado que grandes danos ao DNA (DSBs) não são o gatilho primário, sendo assim, é plausível que a morte ocorra por mecanismos como catástrofe mitótica (devido ao bloqueio em G2/M falho), estresse do retículo endoplasmático ou autofagia desregulada, onde foi um mecanismo observado com o composto modelo tagitinin C (Liao *et al.*, 2011), que também induz parada em G2/M.

Portanto, a ausência de sinal de γ H2AX pode sugerir que enquanto agentes genotóxicos matam células predominantemente via dano ao DNA, os extratos MUF parecem explorar uma outra via metabólica e redox das células tumorais, paralisando sua proliferação e levando-as à morte por estresse celular, o que pode contribuir para o alto índice de seletividade ($IS > 2.2$) analisado.

3.6 Anexina

A análise do ensaio de Anexina V/PI revelou diferenças significativas entre os grupos experimentais. No controle negativo, observou-se baixa taxa de apoptose e morte celular, evidenciando que as células mantiveram sua viabilidade sob condições basais.

Conforme a figura 19, o tratamento MUF 4 promoveu um aumento expressivo na porcentagem de células em apoptose, atingindo valores próximos a 80%, quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$). Esse resultado indica que esse tratamento induziu preferencialmente apoptose, com pouca contribuição de morte celular por outros mecanismos.

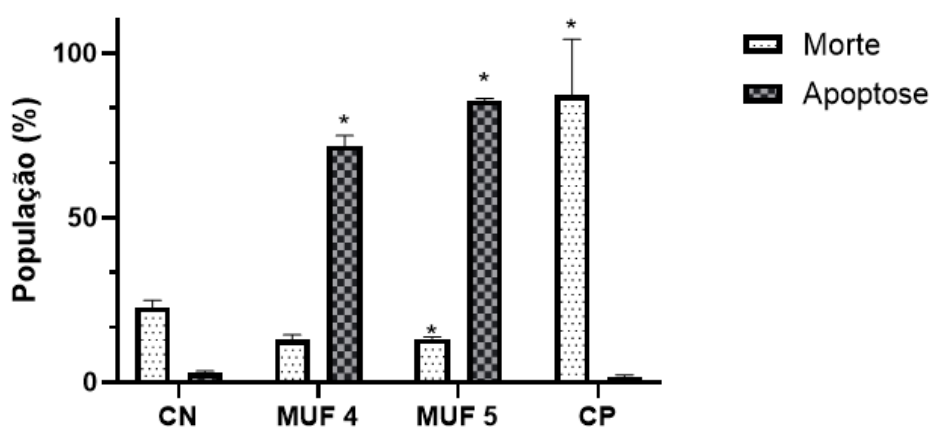


Figura 19: Análise da morte celular e apoptose em células MCF-7 pelo ensaio de Anexina V/PI. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão. O símbolo * indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo ($p < 0,05$). O asterisco (*) indica diferença estatisticamente significativa.

De forma semelhante, o tratamento MUF5 também resultou em uma elevação significativa da apoptose, em torno de 90% das células, acompanhada por um discreto aumento de morte celular, sugerindo que, além da apoptose, uma pequena fração celular evoluiu para estágios tardios de morte ($p < 0,05$ em relação ao controle).

No controle positivo (CP), observou-se padrão distinto, com a morte celular representando a maior porcentagem (> 90%), enquanto a apoptose ocorreu em níveis praticamente nulos. Esse perfil era esperado, uma vez que o controle positivo induz necrose ou morte celular direta.

De maneira geral, os resultados do ensaio de anexina V demonstraram que os extratos MUF4 e MUF5 induziram aumento significativo de apoptose em células MCF-7, em consonância com os resultados de estresse oxidativo e fosforilação de γ H2AX previamente observados. Esse padrão de morte celular programada pode ser explicado pela ativação de vias de sinalização sensíveis a EROs, como a via p38 MAPK, que convergem na indução de apoptose independentemente de danos diretos ao DNA, mecanismo descrito em contextos de desequilíbrio redox em células-tronco e progenitores hematopoiéticos (Richardson *et al.*, 2015).

Adicionalmente, a fosforilação de γ H2AX, quando detectada, pode representar um evento secundário à ativação de caspases durante a apoptose, e não um indicador de genotoxicidade primária mediada por EROs (Bekeschus *et al.*, 2019). Dessa forma, os extratos parecem promover morte celular predominantemente por meio de estresse oxidativo e ativação de vias apoptóticas, sem evidências de lesão genotóxica direta.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste capítulo demonstram que os extratos hidroalcoólicos de *Tithonia diversifolia* apresentam atividade antiproliferativa significativa em modelo *in vitro*, com efeitos dependentes da localidade de coleta e do perfil químico associado a cada amostra. A avaliação da viabilidade celular evidenciou redução significativa da sobrevivência das células MCF-7, com manutenção relativa da viabilidade da linhagem não tumoral MCF-10A para alguns extratos, indicando potencial seletividade citotóxica.

Os ensaios de proliferação celular e clonogenicidade corroboraram esses achados, demonstrando que determinados extratos foram capazes de comprometer não apenas a viabilidade imediata das células tumorais, mas também sua capacidade de proliferação a longo prazo e de formação de colônias. Esses dados reforçam a ação antiproliferativa sustentada dos extratos mais ativos.

A análise dos mecanismos celulares revelou que a atividade observada está associada a alterações no ciclo celular, aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e indução de danos ao DNA, evidenciados pelo aumento da fosforilação da histona H2AX. Além disso, os ensaios de Anexina V e iodeto de propídio indicaram que a morte celular induzida ocorre predominantemente por apoptose, sugerindo um mecanismo de ação programado e biologicamente relevante.

Em conjunto, os resultados indicam que os extratos de *Tithonia diversifolia* exercem efeitos antiproliferativos por meio de múltiplos mecanismos celulares interligados, envolvendo estresse oxidativo, interferência no ciclo celular, dano genotóxico e ativação de vias de morte celular programada. Essas contribuições reforçam o potencial da espécie como fonte de metabólitos bioativos com potencial farmacológico, além de sustentar a importância de estudos integrados que correlacionem perfil químico, origem geográfica e atividade biológica.

Por fim, os dados apresentados neste capítulo fornecem base consistente para a compreensão dos efeitos citotóxicos seletivos de *T. diversifolia* e contribuem para o avanço do conhecimento sobre o potencial antitumoral da espécie, destacando a relevância da continuidade de estudos voltados ao isolamento de compostos ativos e à elucidação mais aprofundada de seus mecanismos moleculares de ação.

Este trabalho foi realizado com o apoio da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Espírito Santo (FAPES).

5. REFERÊNCIAS

ADAMUS, Anna *et al.* *Vincetoxicum arnottianum* modulates motility features and metastatic marker expression in pediatric rhabdomyosarcoma by stabilizing the actin cytoskeleton. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 21, n. 1, p. 136, 2021.

ANANTHARAJU, Preethi G. *et al.* An overview on the role of dietary phenolics for the treatment of cancers. **Nutrition Journal**, v. 15, n. 1, p. 99, 2016.

ATANASOV, Atanas G. *et al.* Natural products in drug discovery: advances and opportunities. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, n. 3, p. 200-216, 2021.

ARAÚJO, Carolina Alves *et al.* Asteraceae family: A review of its allelopathic potential and the case of *Acmella oleracea* and *Sphagneticola trilobata*. **Rodriguésia**, v. 72, p. e01622020, 2021.

BEKESCHUS, S. *et al.* Elevated h2ax phosphorylation observed with kinpen plasma treatment is not caused by ros-mediated DNA damage but is the consequence of apoptosis, **Oxid. Med. Cell. Longev.** 2019.

BOIA-FERREIRA, M. *et al.* TCTP as a therapeutic target in melanoma treatment. **British Journal of Cancer**, v. 117, n. 5, p. 656-665, 2017.

BONNEKOH, Bernd *et al.* Colorimetric growth assay for epidermal cell cultures by their crystal violet binding capacity. **Archives of Dermatological Research**, v. 281, n. 7, p. 487-490, 1989.

BURGGRAFF, Lindsey *et al.* Quantitative prediction of selectivity between the A1 and A2A adenosine receptors. **Journal of Cheminformatics**, v. 12, n. 1, p. 33, 2020.

DADA, Adewumi O. *et al.* Effect of operational parameters, characterization and antibacterial studies of green synthesis of silver nanoparticles using *Tithonia diversifolia*. **PeerJ**, v. 6, p. e5865, 2018.

DUTRA, Jean Carlos *et al.* *Cereus jamacaru* DC hydroalcoholic extract promotes anti-cytotoxic and antitumor activity. **Pharmaceuticals**, v. 11, n. 4, p. 130, 2018.

DUTRA, Rafael C. *et al.* Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological research**, v. 112, p. 4-29, 2016.

GIRGIN, Münteha; ISIK, Sevim; KANTARCI-CARSIBASI, Nigar. Proposing novel natural compounds against Alzheimer's disease targeting acetylcholinesterase. **Plos one**, v. 18, n. 4, p. e0284994, 2023.

GORRINI, Chiara; HARRIS, Isaac S.; MAK, Tak W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. **Nature reviews Drug discovery**, v. 12, n. 12, p. 931-947, 2013.

HADDAD, A. Q. *et al.* Novel antiproliferative flavonoids induce cell cycle arrest in human prostate cancer cell lines. **Prostate cancer and prostatic diseases**, v. 9, n. 1, p. 68-76, 2006.

KATO-NOGUCHI, Hisashi. Involvement of allelopathy in the invasive potential of *Tithonia diversifolia*. **Plants**, v. 9, n. 6, p. 766, 2020.

KOPUSTINSKIENE, Dalia M. *et al.* Flavonoids as anticancer agents. **Nutrients**, v. 12, n. 2, p. 457, 2020.

KRISHAN, Awtar. Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. **The Journal of Cell Biology**, v. 66, n. 1, p. 188-193, 1975.

LIAO, May-Hua *et al.* *Tithonia diversifolia* and its main active component tagitinin C induce survivin inhibition and G2/M arrest in human malignant glioblastoma cells. **Fitoterapia**, v. 82, n. 3, p. 331-341, 2011.

LIN, Chuan-Yi *et al.* Anti-metastatic activity of tagitinin C from *Tithonia diversifolia* in a xenograft mouse model of hepatocellular carcinoma. **Livers**, v. 2, n. 4, p. 400-411, 2022.

LU, Min-Ren *et al.* Induction of apoptosis by *Tithonia diversifolia* in human hepatoma cells. **Pharmacognosy Magazine**, v. 13, n. 52, p. 702, 2017.

PICOT, L. *et al.* Antiproliferative activity of fish protein hydrolysates on human breast cancer cell lines. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 5, p. 1217-1222, 2006.

PRASAD, Sahdeo; GUPTA, Subash C.; TYAGI, Amit K. Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals. **Cancer letters**, v. 387, p. 95-105, 2017.

PRETTI, Irany Rodrigues *et al.* Variation of biochemical and antioxidant activity with respect to the phenological stage of *Tithonia diversifolia* Hemsl.(Asteraceae) populations. **Industrial Crops and Products**, v. 121, p. 241-249, 2018.

RASEKH, Manoochehr; ARSHAD, Muhammad Sohail; AHMAD, Zeeshan. Advances in Drug Delivery Integrated with Regenerative Medicine: Innovations, Challenges, and Future Frontiers. **Pharmaceutics**, v. 17, n. 4, p. 456, 2025.

RAUF, Abdur *et al.* Anticancer potential of quercetin: A comprehensive review. **Phytotherapy research**, v. 32, n. 11, p. 2109-2130, 2018.

RICHARDSON, Christine; YAN, Shan; VESTAL, C. Greer. Oxidative stress, bone marrow failure, and genome instability in hematopoietic stem cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 2, p. 2366-2385, 2015.

ROLNIK, Agata; OLAS, Beata. The plants of the Asteraceae family as agents in the protection of human health. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 6, p. 3009, 2021.

TOYODA, Takeshi *et al.* Detection of γ -H2AX, a biomarker for DNA double-strand breaks, in urinary bladders of N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine-treated rats. **Journal of Toxicologic Pathology**, v. 26, n. 2, p. 215-221, 2013.

VEGA-AVILA, Elisa; PUGSLEY, Michael K. An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells. In: **Proc West Pharmacol Soc.** 2011. p. 4.

WANG, Tian-yang; LI, Qing; BI, Kai-shun. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 1, p. 12-23, 2018.

XUE, Yun-Wei *et al.* Gramicidin A accumulates in mitochondria, reduces ATP levels, induces mitophagy, and inhibits cancer cell growth. **Chemical Science**, v. 13, n. 25, p. 7482-7491, 2022.