UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudo da influência dos fatores ambientais e da variação sazonal dos metabólitos de *Tithonia diversifolia* (Hemls.) A. Gray e avaliação da atividade antioxidante, fotoprotetora e fotoquimiopreventiva dos extratos *in vitro*.

Bruno Leite Sampaio

Ribeirão Preto

2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudo da influência dos fatores ambientais e da variação sazonal dos metabólitos de *Tithonia diversifolia* (Hemls.) A. Gray e avaliação da atividade antioxidante, fotoprotetora e fotoquimiopreventiva dos extratos *in vitro*.

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Doutor em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais
e Sintéticos

Orientado: Bruno Leite Sampaio
Orientador: Prof. Dr. Fernando Batista da
Costa

Ribeirão Preto

2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Sampaio, Bruno Leite

Estudo da influência dos fatores ambientais e da variação sazonal dos metabólitos de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray (Asteraceae) e avaliação da atividade antioxidante, fotoprotetora e fotoquimiopreventiva dos extratos *in vitro*.
Ribeirão Preto, 2015.

147 p.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Da Costa, Fernando Batista.

1. *Tithonia diversifolia*. 2. Sazonalidade. 3. Metabolômica ambiental. 4. Fotoproteção.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Bruno Leite Sampaio

Estudo da influência dos fatores ambientais e da variação sazonal dos metabólitos de *Tithonia diversifolia* (Hemls.) A. Gray e avaliação da atividade antioxidante, fotoprotetora e fotoquimiopreventiva dos extratos *in vitro*.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador(a): Prof. Dr. Fernando Batista da Costa

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Dedico este trabalho a minha família
e aos meus amigos, e em especial a
minha querida avó Mariana que nos
deixou durante o período de
realização deste doutorado.*

Agradecimento

Primeiramente a Deus, sem O qual nenhuma conquista seria possível em minha vida e que sempre me manteve firme, mesmo quando as minhas forças estavam por se esgotar.

Ao meu orientador, o Prof. Dr. Fernando Batista da Costa, que aceitou me orientar neste trabalho mesmo sem nos conhecermos pessoalmente até a véspera do exame de seleção para o doutorado, e com quem eu aprendi muito sobre ciência e sobre a vida, e nada que eu diga será retribuição suficiente por tudo isso.

À professora Dra. RuAngelie Edrada-Ebel por me dar a oportunidade de trabalhar com ela em seu laboratório, na University of Strathclyde, Glasgow, Reino Unido, o que me proporcionou uma experiência de enorme aprendizado científico, assim como a oportunidade de expandir meus horizontes sobre o mundo e de conhecer pessoas incríveis, que muito me ajudaram enquanto lá estive.

Aos meus colegas do Laboratório de Farmacognosia que tanto me ajudaram na execução dos meus experimentos, Erick, Federico, Dani Chagas, Danni Faleiro, Tiago Branquinho, Felipe, Tati, Cris, Marcelo, Lucas e todos os outros que não citei aqui, mas que não foram menos importantes na minha caminhada, meus sinceros agradecimentos, pois foi a companhia, alegria e solidariedade de todos vocês que sempre me ajudou a passar por todos os desafios deste trabalho com um sorriso no rosto.

Gostaria de agradecer em especial cinco pessoas que foram vitais para que eu alcançasse meus resultados: minha grande amiga Rosana, que desde que ingressou em nosso grupo de pesquisa sempre esteve pronta a cooperar comigo, a me ajudar nas análises por LC-MS e me animar quando tudo parecia estar dando errado; minha amiga Rejane, cuja sabedoria e bons conselhos foram imprescindíveis para o planejamento e execução deste trabalho; ao meu amigo peruano Gari, que apesar de chegar ao nosso laboratório quase no final do meu doutorado, é uma pessoa, assim como eu, apaixonada por fitoquímica e que me ajudou de maneira inestimável nesta parte do trabalho; ao meu velho e bom amigo Frederico, que me guiou no início dos meus experimentos com cultura de células e sem o qual eu não teria conseguido desenvolver esta parte do meu trabalho, e por último, o meu mais sincero agradecimento a Marivane Lemos, uma pessoa que foi muito mais que uma companheira e namorada para mim na reta final do meu doutorado, pois ela me ajudou de forma inestimável na realização de vários de meus experimentos e que merece grande crédito por esta tese.

Ao pessoal do Laboratório de Controle de Qualidade, Dayanne, Sônia, Michelle e Jabor, por toda a ajuda na realização dos experimentos de avaliação da atividade antioxidante e fotoprotetora *in vitro*, na interpretação dos resultados e pelos bons momentos de descontração durante o trabalho.

Aos colaboradores que me auxiliaram nas coletas de material nas diferentes regiões do Brasil, em especial, a Profa. Dra. Silvana Zucolotto, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, a Profa. Dra. Maique Weber Biavatti, da Universidade Federal de Santa Catarina, e seu aluno Luiz Pollo, e as minhas amigas Carolina Rodrigues e Myrth Soares pelo envio do material do Distrito Federal e do Pará, respectivamente.

Aos técnicos do Laboratório de Farmacognosia por toda ajuda durante a execução dos experimentos, e em especial, ao técnico Mário Ogasawara, que me ajudou na coleta das matrizes e no plantio do margaridão, e que sempre foi solícito com minhas necessidades dentro do laboratório, sempre demonstrando confiança em mim e no meu trabalho.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na figura de seus funcionários e professores, por toda a infraestrutura de pesquisa disponibilizada para a execução deste trabalho.

Por fim, gostaria de agradecer as pessoas mais importantes da minha vida, minha família, em especial aos meus pais Joldecy Sampaio e Hilda Amada Leite Sampaio, por me cederem a área na qual pude cultivar o margaridão no estado de Goiás e por cuidarem da plantação entre meus intervalos de coleta, além de todo suporte que sempre me deram como pessoa e pesquisador, e também ao meu irmão, Bleno Leite Sampaio, por me ajudar com os problemas relacionados ao computador durante a análise dos dados, a todos vocês, muito obrigado.

Gostaria de agradecer as instituições que proporcionaram as condições necessárias para que eu pudesse realizar este trabalho, em especial:

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
Processo nº 2011/13361-6

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
Processo nº 99999.003967/2014-00

University of Strathclyde, Glasgow, Scotland, United Kingdom

*“A ciência pode determinar o que é,
não o que deveria ser.”*

Albert Einstein

RESUMO

SAMPAIO, B. L. **Estudo da influência dos fatores ambientais e da variação sazonal dos metabólitos de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray e avaliação da atividade antioxidante, fotoprotetora e fotoquimiopreventiva dos extratos *in vitro*.** 2015. 147 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

O margaridão, nome popular da espécie *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray (Asteraceae) é uma planta invasiva originária do México e da América Central, encontrada em diferentes ecossistemas tropicais e subtropicais. É utilizada popularmente no tratamento de diferentes problemas de saúde como processos inflamatórios, malária e gastrite. Em detrimento aos vários trabalhos de cunho farmacológico e fitoquímico presentes na literatura sobre esta planta, existem escassos estudos sobre a variação de seus metabólitos, principalmente considerando os efeitos de sazonalidade e influência ambiental, de forma que estudos relacionando essa possível variação com a atividade biológica são ainda mais raros. Neste trabalho investigou-se a influência de diferentes fatores ambientais abióticos (clima e solo) sobre os metabólitos dessa planta pela combinação de técnicas analíticas modernas como UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS e RMN (*J-resolved*), aliadas a métodos estatísticos multivariados, e o efeito da variação do perfil metabólico sobre as atividades antioxidante e fotoprotetora *in vitro* utilizando-se cultura de células. A análise das amostras de *T. diversifolia* por UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS e por RMN (*J-resolved*) proporcionou novas informações que permitiram elucidar melhor o padrão de variação sazonal do perfil metabólico para as diferentes partes do vegetal relacionada à influência de fatores do ambiente, utilizando métodos de análise multivariada não supervisionados (HCA e PCA) e supervisionados (OPLS-DA). Foi possível também observar diferenças quanto ao perfil metabólico dos extratos obtidos de espécimes de *T. diversifolia* coletados em diferentes regiões do Brasil utilizando-se uma abordagem semelhante a utilizada para o estudo de variação sazonal, destacando-se que apesar das diferenças encontradas, foi possível observar a presença de lactonas sesquiterpênicas como compostos majoritários na maioria das amostras analisadas. Os ensaios para atividade antioxidante *in vitro*, possibilitaram a escolha dos extratos com melhores características para os ensaios de avaliação da eficácia fotoprotetora e fotoquimiopreventiva *in vitro*. Os resultados dos ensaios para avaliação da atividade antioxidante demonstraram a existência de diferenças para esse tipo de atividade entre as partes da planta, sendo as folhas e raízes mais ativas, principalmente pelo mecanismo de sequestro de radicais livres no meio, de forma que extratos de folhas e raízes foram utilizados para os ensaios em cultura de células. Os dois extratos avaliados apresentaram atividade fotoprotetora para as duas linhagens celulares testadas após exposição à radiação UV-A, reduzindo a formação de EROs intracelular, e pelo aumento da viabilidade celular de queratinócitos HaCaT expostos à radiação UV-B. Os extratos de *T. diversifolia* não apresentaram fototoxicidade significativa para nenhuma das linhagens celulares testadas após exposição à radiação UV-B. A fotoquimioproteção foi observada para a linhagem HaCaT, na qual o extrato de folhas aumentou a viabilidade celular após a exposição à radiação UV-B nas três maiores concentrações testadas, sendo que na maior concentração (20,0 µg/mL), não houve diferença estatisticamente significativa em relação ao controle não irradiado. O extrato de folhas também apresentou atividade fotoquimiopreventiva pela inibição da peroxidação lipídica em cultura de queratinócitos HaCaT expostos a radiação UV-B. Considerando-se todos os resultados aqui apresentados, destacamos a relação ambiente-metabolismo em *T. diversifolia* e o conjunto de técnicas analíticas e estatísticas utilizadas, as quais nos permitiram obter dados confiáveis que contribuem para uma compreensão holística do papel

do metabolismo na adaptação da planta ao meio ambiente, e o potencial desta abordagem na busca racional de produtos naturais com atividades biológicas de interesse.

Palavras-chave: *Tithonia diversifolia*. Sazonalidade. Metabolômica ambiental. Fotoproteção

ABSTRACT

SAMPAIO, B. L. **The influence of environmental factors and seasonal variation of *Tithonia diversifolia* (Hemls.) A. Gray metabolites and evaluation of the antioxidant, photoprotective and photochemopreventive activities of the extracts *in vitro*.** 2015. 147 f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Margaridão, the common name of the species *Tithonia diversifolia* (Hemls.) A. Gray (Asteraceae), is an invasive plant native from both Mexico and Central America, encountered in different tropical and subtropical ecosystems. It is popularly used for the treatment of various health problems such as inflammation, malaria, and gastritis. Despite the various pharmacologic and phytochemical studies in the literature about this plant, there are few studies on the variation of its metabolites, especially considering the effects of seasonality and environmental influence, so that studies relating this possible variation to biological activity are still rarer. In this work we investigated the influence of different abiotic environmental factors (climate and soil) on the metabolites of this plant by combining modern analytical techniques such as UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS and NMR (J-resolved), combined with multivariate statistical methods, and the effect of the variation of the metabolic profile for the antioxidant and photoprotective activities *in vitro* using cultured cells. The analysis of samples of *T. diversifolia* by UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS and NMR (J-resolved) provided new information which enable to elucidate better the seasonal variation pattern of the metabolic profile for the different parts of the plant related to the influence of the environmental factors, using unsupervised (HCA and PCA) and supervised (OPLS-DA) multivariate analysis methods. It was also possible to observe differences in the metabolic profiles of extracts of *T. diversifolia* specimens collected in different regions of Brazil using a similar approach to that used for the study of seasonal variation, highlighting that, despite the differences, it was possible observe the presence of sesquiterpene lactones as major compounds in most of the samples analysed. The assays for antioxidant activity *in vitro*, allowed the choice of extracts with better features for the photoprotective and photochemopreventive *in vitro* efficacy tests. The results of the assays to evaluate the antioxidant activity demonstrated the existence of differences for this activity between the parts of the plant, being the leaves and roots more actives, mainly by scavenging free radical mechanism, so that leaf and root extracts were used for testing in cell culture. The two extracts showed evaluated photoprotective activity for both cell lines tested after exposure to UV-A radiation, by reducing intracellular ROS formation, and increased cell viability of HaCaT keratinocytes exposed to UV-B radiation. The extracts of *T. diversifolia* have shown no significantly phototoxicity for any of the tested cell lines after exposure to UV-B radiation. Photochemoprevention was observed for the strain HaCaT in which the leaf extract increased the cell viability after exposure to UV-B radiation at the three highest tested concentrations, while at higher concentration (20.0 mg/mL), there was no difference statistically significant compared to non-irradiated control. The leaf extract also showed photochemopreventive activity by inhibiting lipid peroxidation in cultured HaCaT keratinocytes exposed to UV-B radiation. Considering all results presented herein, we highlight the environment-metabolism relationship for *T. diversifolia* and the selected set of analytical and statistical techniques allowed us to obtain reliable data that contributed to a holistic understanding of the role of metabolism in the plant's adaptation to the environment, and the potential of this approach to the rational search for natural products with biological activity of interest.

Keywords: *Tithonia diversifolia*. Seasonality. Environmental metabolomics. Photoprotection

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Área de cultivo de <i>T. diversifolia</i> no horto de plantas de medicinais da FCFRP-USP - Ribeirão Preto-SP.....	32
Figura 2. Área de cultivo de <i>T. diversifolia</i> localizada na Faz. Santo Antônio - Pires do Rio-GO.....	33
Figura 3. Precipitação acumulada mensal (mm) para os municípios de Pires do Rio-GO e Ribeirão Preto-SP entre os meses de março de 2012 a fevereiro de 2014.....	34
Figura 4. Temperatura média mensal (°C) para os municípios de Pires do Rio-GO e Ribeirão Preto-SP entre os meses de março de 2012 a fevereiro de 2014.....	35
Figura 5. Umidade do ar média mensal (%) para os municípios de Pires do Rio-GO e Ribeirão Preto-SP entre os meses de março de 2012 a fevereiro de 2014.....	35
Figura 6. Radiação solar média mensal (kJ/m ²) para os municípios de Pires do Rio-GO e Ribeirão Preto-SP entre os meses de março de 2012 a fevereiro de 2014. As áreas em cinza no gráfico representam a estação chuvosa e as áreas em branco a estação seca.....	36
Figura 7. Proporção de metabólitos secundários nos óleos essenciais de <i>T. diversifolia</i> divididos por classe.....	37
Figura 8. CCD comparativa para identificação dos flavonoides luteolina (nº 1 – contorno preto) e hispidulina (nº 6 – contorno vermelho) nas sub-frações FPS2 e FPS3 a partir de comparação com padrões de flavonoides.....	38
Figura 9. CCD comparativa para identificação de tagitinina A (contorno preto) e tagitinina C (contorno vermelho) nas sub-frações FBEAF1B-1 e FBEAF1B-2.....	39
Figura 10. Estrutura química da substância FBEAF 7.25 – Ácido 4- <i>O</i> -cafeoil-2- <i>C</i> -metil-D-treônico.....	40
Figura 11. Estrutura química da substância FBEAF 7.25-lac – 3- <i>O</i> -cafeoil-2- <i>C</i> -metil-D-treono-1,4-lactona.....	40
Figura 12. Estrutura química da substância FAEAI 4.5 – Ácido protocatecuico.	43
Figura 13. Estrutura química da substância FAEAI 4.6 – Ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico.....	44
Figura 14. Estrutura química da substância FAEAI 4.9 – Ácido cafeico.....	45

Figura 15. Estrutura química da substância FAEAI 5.5 – Ácido 4,5-O-dicafeoilquínico.....	46
Figura 16. Estrutura química da substância FAEAI 5.6 – Ácido 3,5-O-dicafeoilquínico.....	48
Figura 17. Estrutura química da substância FAEAI 5.8 – Ácido 3,4-O-dicafeoilquínico.....	49
Figura 18. Dendrograma da análise de HCA para os dados concatenados obtidas a partir dos extratos de folhas de <i>T. diversifolia</i> com a proposta de agrupamento.....	52
Figura 19. <i>Score plot</i> da análise por PCA para os dados concatenados obtidos a partir dos extratos de folhas de <i>T. diversifolia</i> com a proposta de agrupamento.....	53
Figura 20. <i>Loading plots</i> da análise por PCA para os dados concatenados (A) e de <i>J-resolved</i> (B) obtidos a partir dos extratos de folhas de <i>T. diversifolia</i> e a relação com os fatores ambientais e classes discriminantes de metabolitos.	54
Figura 21. <i>Score plot</i> da análise por OPLS-DA para os dados concatenados obtidos a partir dos extratos de folhas de <i>T. diversifolia</i> com a proposta de agrupamento.	55
Figura 22. Dendrograma da análise de HCA para os dados concatenados obtidos a partir dos extratos de caules de <i>T. diversifolia</i> com a proposta de agrupamento.....	56
Figura 23. <i>Score plot</i> da análise por PCA para os dados concatenados obtidos a partir dos extratos de caules de <i>T. diversifolia</i> com a proposta de agrupamento.....	57
Figura 24. <i>Loading plots</i> da análise por PCA para os dados concatenados (A) e de <i>J-resolved</i> (B) obtidos a partir dos extratos de caules de <i>T. diversifolia</i> e a relação com os fatores ambientais e classes discriminantes de metabolitos.	58
Figura 25. <i>Score plot</i> da análise por OPLS-DA para os dados concatenados obtidos a partir dos extratos dos caules de <i>T. diversifolia</i> com a proposta de agrupamento.....	59
Figura 26. Dendrograma da análise de HCA para os dados concatenados obtidos a partir dos extratos de raízes de <i>T. diversifolia</i> com a proposta de agrupamento.	60
Figura 27. <i>Score plot</i> da análise por PCA para os dados concatenados obtidos a partir dos extratos de raízes de <i>T. diversifolia</i> com a proposta de agrupamento.	61
Figura 28. <i>Loading plots</i> da análise por PCA para os dados concatenados (A) e de <i>J-resolved</i> (B) obtidos a partir dos extratos de raízes de <i>T. diversifolia</i> e a relação com os fatores ambientais e classes discriminantes de metabolitos.	62

- Figura 29. *Score plot* da análise por OPLS-DA para os dados concatenados obtidos a partir dos extratos de raízes de *T. diversifolia* com a proposta de agrupamento..... 63
- Figura 30. Dendrograma da análise de HCA para os dados concatenados obtidos a partir dos extratos de inflorescências de *T. diversifolia* com a proposta de agrupamento. 64
- Figura 31. *Score plot* da análise por PCA para os dados concatenados obtidos a partir dos extratos de inflorescências de *T. diversifolia* com a proposta de agrupamento. 65
- Figura 32. *Loading plots* da análise por PCA para os dados concatenados (A) e de *J-resolved* (B) obtidos a partir dos extratos de inflorescências de *T. diversifolia* e a relação com os fatores ambientais e classes discriminantes de metabolitos. 66
- Figura 33. *Score plot* da análise por OPLS-DA para os dados concatenados obtidos a partir dos extratos de inflorescências de *T. diversifolia* com a proposta de agrupamento..... 67
- Figura 34. Plote da análise por HCA (método de Ward) para as amostras de óleos essenciais das folhas e inflorescências de *T. diversifolia* coletadas nos estados de Goiás e São Paulo, com proposta de agrupamento..... 68
- Figura 35. *Biplot (scores x loadings)* da análise por PCA para as amostras de óleos essenciais de folhas e inflorescências de *T. diversifolia* com proposta de agrupamento e identificação das variáveis discriminantes..... 69
- Figura 36. *Score plot* da análise por PCA para as amostras de óleos essenciais de folhas e inflorescências de *T. diversifolia* com proposta de agrupamento e relação com as variáveis ambientais. 70
- Figura 37. *Score plot* da análise por OPLS-DA para as amostras de óleos essenciais de folhas e inflorescências de *T. diversifolia* com proposta de agrupamento..... 71
- Figura 38. Dendrograma da análise de HCA para os dados de UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS obtidos a partir dos extratos de *T. diversifolia* coletados em diferentes partes do Brasil com a proposta de agrupamento. 72
- Figura 39. Gráfico do tipo *biplot (scores x loadings)* da PCA realizada com os dados de UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS obtidos a partir dos extratos de *T. diversifolia* coletados em diferentes partes do Brasil com a proposta de agrupamento..... 73
- Figura 40. *Score plot* (com dois eixos) da análise por OPLS-DA realizada com os dados de UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS obtidos a partir dos extratos de *T. diversifolia* coletados em diferentes partes do Brasil com a proposta de agrupamento..... 74

- Figura 41. *Score plot* (com três eixos) da análise por OPLS-DA realizada com os dados de UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS obtidos a partir dos extratos de *T. diversifolia* coletados em diferentes partes do Brasil com a proposta de agrupamento..... 74
- Figura 42. Gráfico de regressão sigmoidal (dose-resposta) da concentração x viabilidade celular para o extrato FG1213 em fibroblasto L929..... 80
- Figura 43. Gráfico de regressão sigmoidal (dose-resposta) da concentração x viabilidade celular para o extrato FG1213 em queratinócito HaCaT..... 81
- Figura 44. Atividade fotoprotetora dos extratos FG1213 e RS913 *in vitro* medida pela viabilidade celular (%) em cultura de fibroblastos L929 expostos a 0,5 J/cm² de radiação UV-B..... 82
- Figura 45. Atividade fotoprotetora dos extratos FG1213 e RS913 *in vitro* medida pela viabilidade celular (%) em cultura de queratinócitos HaCaT expostos a 0,5 J/cm² de radiação UV-B..... 82
- Figura 46. Atividade fotoprotetora dos extratos FG1213 e RS913 *in vitro* medida pela quantidade de EROs (expressa por unidade de emissão de fluorescência – UEF) formada em cultura de fibroblastos L929 expostos a 10 J/cm² de radiação UV-A. 83
- Figura 47. Atividade fotoprotetora dos extratos FG1213 e RS913 *in vitro* medida pela quantidade de EROs (expressa por unidade de emissão de fluorescência – UEF) formada em cultura de queratinócitos HaCaT expostos a 10 J/cm² de radiação UV-A. 84
- Figura 48. Avaliação da fototoxicidade do extrato FG1213 *in vitro*, utilizando-se cinco concentrações diferentes, medida pela viabilidade celular (%) em cultura de fibroblastos L929 expostos a 0,6 J/cm² de radiação UV-B..... 85
- Figura 49. Avaliação da fototoxicidade do extrato RS913 *in vitro*, utilizando-se cinco concentrações diferentes, medida pela viabilidade celular (%) em cultura de fibroblastos L929 expostos a 0,6 J/cm² de radiação UV-B..... 85
- Figura 50. Avaliação da fototoxicidade do extrato FG1213 *in vitro*, utilizando-se cinco concentrações diferentes, medida pela viabilidade celular (%) em cultura de queratinócitos HaCaT expostos a 0,3 J/cm² de radiação UV-B..... 86
- Figura 51. Avaliação da fototoxicidade do extrato RS913 *in vitro*, utilizando-se cinco concentrações diferentes, medida pela viabilidade celular (%) em cultura de queratinócitos HaCaT expostos a 0,3 J/cm² de radiação UV-B..... 86
- Figura 52. Atividade fotoquimiopreventiva dos extratos FG1213 e RS913 *in vitro* medida pela quantidade de MDA (expressa em nM de MDA/μg de proteínas totais) formado em cultura de fibroblastos L929 expostos a 30,0 J/cm² de radiação UV-B..... 87

Figura 53. Atividade fotoquimiopreventiva dos extratos FG1213 e RS913 *in vitro* medida pela quantidade de MDA (expressa em nM de MDA/ μ g de proteínas totais) formado em cultura de queratinócitos HaCaT expostos a 7,5 J/cm² de radiação UV-B..... 88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Níveis de macro e micronutrientes nos solos de cultivo em Pires do Rio-GO e Ribeirão Preto-SP.	33
Tabela 2: Níveis dos demais indicadores de fertilidade para os solos de cultivo em Pires do Rio-GO e Ribeirão Preto-SP.	34
Tabela 3: Apresentação dos três componentes majoritários em cada óleo essencial de <i>T. diversifolia</i> e suas respectivas proporções (em porcentagem).	37
Tabela 4: Dados do espectro de RMN ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) para a substância FBEAF 7.25, identificada como ácido 4- <i>O</i> -cafeoil-2- <i>C</i> -metil-D-treônico (δ em ppm, J em Hz).	41
Tabela 5: Dados do espectro de RMN ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) para a substância FBEAF 7.25-lac, identificada como ácido 3- <i>O</i> -cafeoil-2- <i>C</i> -metil-D-treono-1,4-lactona (δ em ppm, J em Hz).	41
Tabela 6: Pureza percentual das substâncias isoladas da fração FAEAI do EAI de <i>T. diversifolia</i> , obtidos em CLAE-UV-DAD.	42
Tabela 7: Dados do espectro de RMN ^1H (400 MHz) e ^{13}C (<i>HSQC</i> e <i>HMBC</i>) para a substância FAEAI 4.5, identificada como ácido protocatecuico (δ em ppm, J em Hz).	43
Tabela 8: Dados do espectro de RMN ^1H (400 MHz) e ^{13}C (<i>HSQC</i> e <i>HMBC</i>) para a substância FAEAI 4.6, identificada como ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico (δ em ppm, J em Hz).	44
Tabela 9: Dados do espectro de RMN ^1H (400 MHz) e ^{13}C (<i>HSQC</i> e <i>HMBC</i>) para a substância FAEAI 4.9, identificada como ácido cafeico (δ em ppm, J em Hz).	45
Tabela 10: Dados do espectro de RMN ^1H (400 MHz) e ^{13}C (<i>HSQC</i> e <i>HMBC</i>) para a substância FAEAI 5.5, identificada como ácido 4,5- <i>O</i> -dicafeoilquínico (δ em ppm, J em Hz).	46
Tabela 11: Dados do espectro de RMN ^1H (400 MHz) e ^{13}C (<i>HSQC</i> e <i>HMBC</i>) para a substância FAEAI 5.6, identificada como ácido 3,5- <i>O</i> -dicafeoilquínico (δ em ppm, J em Hz).	48
Tabela 12: Dados do espectro de RMN ^1H (400 MHz) e ^{13}C (<i>HSQC</i> e <i>HMBC</i>) para a substância FAEAI 5.8, identificada como ácido 3,4- <i>O</i> -dicafeoilquínico (δ em ppm, J em Hz).	50

Tabela 13: Variáveis discriminantes para os grupos de amostras dos óleos essenciais de <i>T. diversifolia</i>	71
Tabela 14: Padrões utilizados na etapa de desreplicação dos extratos de <i>T. diversifolia</i> por UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS.	75
Tabela 15: Substâncias identificadas nos extratos de <i>T. diversifolia</i> dentre as variáveis discriminantes determinadas pela análise quimiométrica, após desreplicação em UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS.	76
Tabela 16: Valores de CE ₅₀ e PAR obtidos para os extratos de <i>T. diversifolia</i> utilizados na avaliação da atividade antioxidante pelo ensaio do DPPH.	79
Tabela 17: Valores de CE ₅₀ (expressos em µg/mL) obtidos com os diferentes ensaios para avaliação da atividade antioxidante para os extratos de <i>T. diversifolia</i>	79

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Fórmula para escalonamento de variáveis pelo método de Pareto.....	20
Equação 2. Fórmula para transformação de variáveis pelo método do arco seno.....	21
Equação 3. Fórmula para transformação logarítmica de variáveis.....	21
Equação 4. Fórmula de escalonamento de variáveis para fusão de dados pelo método de concatenação..	22

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACG: Ácidos clorogênicos

AcOEt: Acetato de etila

AINEs: Anti-inflamatórios não esteroidais

ATB: Ácido tiobarbitúrico

BHT: Hidroxitolueno butilado

CCD: Cromatografia em camada delgada

CE₅₀: Concentração efetiva capaz de reduzir a concentração de DPPH em 50%

CG-EM: Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

CG-EM: Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

CI₅₀: Concentração capaz de inibir a viabilidade celular em 50%

CLAE-UV-DAD: Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos

CLV: Cromatografia líquida a vácuo

CTC: Capacidade de troca de cátions efetiva

CV: Coeficiente de variação

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*[®]

DP: Desvio padrão

DPPH: *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*

EAF: Extrato aquoso das folhas

EAI: Extrato aquoso das inflorescências

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

FAEAF: Fração acetato de etila do extrato aquoso das folhas

FAEAI: Fração acetato de etila do extrato aquoso das inflorescências

FAqEAF: Fração aquosa do extrato aquoso das folhas

FAqEAI: Fração aquosa do extrato aquoso das inflorescências

FBEAF: Fração butanólica do extrato aquoso das folhas

FBEAI: Fração butanólica do extrato aquoso das inflorescências

FCFRP: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

FDEAI: Fração diclorometano do extrato aquoso das inflorescências

FHEAI: Fração hexânica do extrato aquoso das inflorescências

H+Al: Potencial de acidez do solo

HCA: Análise hierárquica de agrupamentos

HMBC: *Heteronuclear Multiple Bond Correlation Spectroscopy*

HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*

HSQC: *Heteronuclear Single Quantum Correlation Spectroscopy*

J: Constante de acoplamento

LST: Lactonas sesquiterpênicas

m/z: Relação massa/carga

MDA: Malondialdeído

MeCN: Acetonitrila

MeOH: Metanol

mM = milimolar

MO: Matéria orgânica

NF- κ B: Fator Nuclear kappa B

nm: comprimento de onda em nanômetro

OE: Óleo essencial

OPLS-DA: *Orthogonal Partial Least Squares-Discriminant Analysis*

PAR: Poder antirradicalar

PCA: Análise de componentes principais

ppm: parte por milhão

Ppt: Precipitação

Rad: Radiação

RMN: Ressonância magnética nuclear

SB: Soma de bases no solo

SBF: Soro bovino fetal

Temp: Temperatura

UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS: Cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas de alta resolução

Umi: Umidade do ar

UV: Radiação ultravioleta

V%: Porcentagem por saturação de bases no solo.

XOD: Xantina oxidase

δ : Deslocamento químico

λ : Comprimento de onda

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE EQUAÇÕES	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xii
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	7
3 MATERIAL E MÉTODOS	9
3.1 Obtenção das Amostras	9
3.1.1 Obtenção e Preparo do Material Vegetal	9
3.1.2 Obtenção de Amostras de Solo e Dados Climáticos	10
3.2 Preparação dos Extratos e Extração do Óleo Essencial	11
3.2.1 Extratos Aquosos	11
3.2.2 Obtenção do Óleo Essencial	11
3.3 Análise Fitoquímica dos Extratos	11
3.3.1 Análise dos Óleos Essenciais	11
3.3.2 Fracionamento do extrato aquoso das folhas (EAF) e isolamento de componentes majoritários	12
3.3.3 Fracionamento do extrato aquoso das inflorescências (EAI) e isolamento de componentes majoritários	13
3.3.4 Identificação e elucidação estrutural das substâncias isoladas	15
3.4 Análise da variação sazonal e influência ambiental	15
3.4.1 Preparo dos extratos para análise por UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS	15
3.4.2 Preparo dos extratos para análise por RMN ¹ H e <i>J-resolved</i>	16
3.4.3 Análise dos extratos de <i>T. diversifolia</i> por UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS	17
3.4.4 Análise dos óleos essenciais por CG-EM	17
3.4.5 Análise dos extratos por RMN bidimensional (<i>J-resolved</i>)	18
3.4.6 Análise de variação regional dos metabólitos de <i>T. diversifolia</i>	18
3.5 Processamento dos dados obtidos para análise multivariada	19
3.5.1 Dados obtidos por UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS	19
3.5.2 Processamento dos dados obtidos por RMN	20
3.5.3 Processamento dos dados ambientais	21
3.5.4 Análise multivariada dos dados de RMN combinados com os dados de UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS	21

3.5.5	Análise multivariada dos dados obtidos para o estudo da variação regional dos metabólitos de <i>T. diversifolia</i>	22
3.5.6	Análise multivariada dos dados obtidos por CG-EM	22
3.6	Desreplicação dos extratos por UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS	23
3.7	Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	23
3.7.1	Seleção dos extratos para o ensaio de atividade antioxidante pelo ensaio do DPPH	23
3.7.2	Ensaio de atividade sequestrante de radicais livres pelo método do DPPH.....	24
3.7.3	Determinação da atividade antioxidante sobre a enzima xantina oxidase (XOD) por quimiluminescência com oxidação do luminol	25
3.7.4	Determinação da atividade inibidora da peroxidação lipídica <i>in vitro</i>	26
3.8	Ensaio para avaliação da fotoproteção e fototoxicidade dos extratos de <i>T. diversifolia</i> em cultura de células	27
3.8.1	Manutenção da cultura de células	27
3.8.2	Avaliação da toxicidade celular (<i>in vitro</i>) pelo ensaio de incorporação do Vermelho Neutro.....	28
3.8.3	Avaliação <i>in vitro</i> da eficácia fotoprotetora dos extratos por medida da viabilidade das células expostas à radiação UV-B	28
3.8.4	Avaliação <i>in vitro</i> da eficácia fotoprotetora dos extratos por medida da quantidade de espécies reativas de oxigênio (EROs) induzidas pela exposição à radiação UV-A.....	29
3.8.5	Avaliação <i>in vitro</i> da fototoxicidade dos extratos pela medida da viabilidade das células expostas a radiação UV-B.....	29
3.8.6	Avaliação <i>in vitro</i> da eficácia fotoquimiopreventiva dos extratos pelo ensaio de geração de peróxidos lipídicos em cultura de células após a exposição à radiação UV-B.....	30
3.9	Análise estatística dos dados obtidos pelos ensaios <i>in vitro</i>	31
4	RESULTADOS	32
4.1	Amostras e Dados de Coletas	32
4.1.1	Cultivo e Coleta do Material	32
4.1.2	Dados Ambientais	33
4.2	Análise fitoquímica dos óleos essenciais e extratos.....	36
4.2.1	Análise dos óleos essenciais	36
4.2.2	Substâncias isoladas do EAF	38
4.2.3	Substâncias isoladas do EAI.....	42
4.3	Análise da variação sazonal dos metabólitos secundários e influência ambiental	50
4.3.1	Análise dos extratos de <i>T. diversifolia</i> por UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS e RMN ¹ H e <i>J-resolved</i>	50
4.3.2	Análise da variação dos óleos essenciais por CG-EM	67
4.4	Análise da variação regional dos metabólitos de <i>T. diversifolia</i>	72
4.5	Desreplicação dos extratos por UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS	75
4.6	Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	79
4.7	Ensaio para avaliação da fotoproteção e fototoxicidade dos extratos de <i>T. diversifolia</i> em cultura de células	80
4.7.1	Avaliação da toxicidade celular (<i>in vitro</i>) pelo ensaio de incorporação do Vermelho Neutro.....	80
4.7.2	Avaliação <i>in vitro</i> da eficácia fotoprotetora dos extratos por medida da viabilidade das células expostas à radiação UV-B	81

4.7.3	Avaliação <i>in vitro</i> da eficácia fotoprotetora dos extratos por medida da quantidade de espécies reativas de oxigênio (EROs) induzidas pela exposição à radiação UV-A.....	83
4.7.4	Avaliação <i>in vitro</i> da fototoxicidade dos extratos pela medida da viabilidade das células expostas a radiação UV-B.....	84
4.7.5	Avaliação <i>in vitro</i> da eficácia fotoquimiopreventiva dos extratos pelo ensaio de geração de peróxidos lipídicos em cultura de células após a exposição à radiação UV-B	87
5	DISCUSSÃO	89
6	CONCLUSÕES	106
7	REFERÊNCIAS.....	108
	APÊNDICE A	118
	APÊNDICE B	119
	APÊNDICE C	120
	APÊNDICE D	121
	APÊNDICE E.....	122
	APÊNDICE F.....	123
	APÊNDICE G	124
	APÊNDICE H	125
	APÊNDICE I.....	126
	APÊNDICE J.....	127
	APÊNDICE K	128
	APÊNDICE L.....	129
	APÊNDICE M.....	130
	APÊNDICE N	131
	APÊNDICE O	132

APÊNDICE P	133
APÊNDICE Q	134
APÊNDICE R	135
APÊNDICE S	136
APÊNDICE T	137
APÊNDICE U	138
APÊNDICE V	139
APÊNDICE W	140
APÊNDICE X	141
APÊNDICE Y	142
APÊNDICE Z	143
APÊNDICE AA	144
APÊNDICE BB	145
APÊNDICE CC	146
APÊNDICE DD	147

1 INTRODUÇÃO

Diversas espécies da família Asteraceae são largamente utilizadas em várias partes do mundo para fins terapêuticos, sendo que muitas destas apresentam suas monografias descritas em farmacopeias e compêndios farmacêuticos. Do ponto de vista químico, alguns grupos de metabólitos presentes em Asteraceae destacam-se devido a suas relações com as atividades biológicas apresentadas por espécies desta família, principalmente as substâncias fenólicas (ácidos fenólicos simples, ésteres do ácido *trans*-cinâmico e flavonoides) e os terpenóides (lactonas sesquiterpênicas e diterpenos) (AGRAWAL; TALELE, 2011; ALVARENGA et al., 2001; CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2004; CHAGAS-PAULA et al., 2012).

Uma espécie da família Asteraceae que vem sendo objeto de pesquisas nos últimos anos devido as suas atividades biológicas tanto *in vitro* quanto *in vivo* é o margaridão ou girassol mexicano, nomes populares pelos quais é conhecida a espécie *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray. Esta planta é uma erva perene, nativa do México e América Central, que também cresce em partes da América do Norte, África e Ásia, sendo uma espécie aclimatada no Brasil e dispersa por todo o país (SÁNCHEZ-MENDOZA et al., 2011). Esta espécie ocorre em abundância em várias regiões do Brasil, assim como na cidade de Ribeirão Preto-SP, sendo encontrada em terrenos e ao longo de ruas e avenidas, bem como em rodovias no entorno da cidade.

Estudos realizados nos últimos anos demonstraram que extratos e metabólitos secundários isolados de folhas e inflorescências de *T. diversifolia* apresentam as seguintes atividades biológicas: anti-inflamatória (CHAGAS-PAULA et al., 2011; OWOYELE et al., 2004), antimalárica (OYEWOLE et al., 2008), citotóxica (KURODA et al., 2007), gastroprotetora (SÁNCHEZ-MENDOZA et al., 2011), antimicrobiana (LIASU; AYANDELE, 2008; OBAFEMI et al., 2006) e quimiopreventiva para câncer (GU et al., 2002).

Em um estudo de toxicologia em doses repetidas *in vivo* com extratos das folhas do margaridão realizado na FCFRP-USP, foi detectada toxicidade por via oral significativa com o infuso e o extrato de lavagem foliar rico em lactonas sesquiterpênicas (LST), o que impede o uso oral das folhas da planta contendo LST (PASSONI et al., 2013), contudo, estudos descrevendo atividades biológicas tanto *in vitro* quanto *in vivo* com os extratos das folhas para utilização por via tópica ainda não foram descritos.

Dentre as substâncias fenólicas encontradas nas folhas *T. diversifolia*, os ácidos clorogênicos (ACG) e os flavonoides destacam-se como os principais, sendo que os extratos

ricos nessas substâncias, de acordo com trabalho realizado por Chagas-Paula et al. (2011), apresentam atividade anti-inflamatória superior ao lavado foliar rico em LST e até mesmo superior ao fármaco anti-inflamatório de referência indometacina, e com a vantagem de não terem apresentado, neste estudo, efeitos adversos típicos dos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) ou esteroidais.

Várias substâncias pertencentes à classe dos flavonoides possuem atividade anti-inflamatória já descrita, como por exemplo, a quercetina, um flavonoide de ampla distribuição entre os vegetais. Extratos obtidos de alguns vegetais, ricos em quercetina e/ou seus heterosídeos, demonstraram atividade anti-inflamatória em testes biológicos, sendo esta atribuída à quercetina ou aos seus heterosídeos, como demonstraram diversos estudos realizados nas últimas décadas (FONSECA et al., 2007; HARBORNE; WILLIAMS, 2000; SIMÕES et al., 1988). Em trabalho realizado por Vicentini et al. (2011), demonstrou-se a atividade anti-inflamatória da quercetina, em modelo de inflamação de pele causada por radiação ultravioleta, através de supressão da via do fator de transcrição nuclear NF- κ B.

Os ACG são outra classe de substâncias encontradas em extratos de *T. diversifolia* e que estão diretamente relacionados à sua ação anti-inflamatória (CHAGAS-PAULA et al., 2011). Estas substâncias pertencem à classe dos ácidos fenólicos ou *trans*-cinâmicos, um grupo de grande diversidade estrutural e ampla distribuição no reino vegetal, sendo os ácidos clorogênicos classificados como ésteres de ácidos fenólicos (cinâmico, cafeico, ferúlico e sinápico) esterificados principalmente com os ácidos quínico ou chiquímico, grupo em que se destacam os derivados do ácido cafeico (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2004). Os possíveis mecanismos da ação anti-inflamatória dos ACG parecem estar relacionados com a inibição da síntese de fatores pró-inflamatórios (prostaglandinas, leucotrienos e NF- κ B) (SANTOS, 2006), assim como interferindo na migração de leucócitos (BELINATI, 2010).

As substâncias fenólicas apresentam outras propriedades interessantes, do ponto de vista biológico, tais como antioxidante e fotoprotetora (KRISHNAIAH; SARBATLY; NITHYANANDAM, 2011; SCHREINER et al., 2012; VICENTINI et al., 2011). Extratos de plantas ricos em substâncias fenólicas, principalmente as derivadas do ácido *trans*-cinâmico como os flavonoides e ACG, são amplamente descritos por apresentarem atividade tanto antioxidante quanto fotoprotetora *in vitro* (utilizando modelo de cultura de células da pele), e também *in vivo* (em modelos murinos e em testes com humanos) (AGATI; TATTINI, 2010; ALLEMANN; BAUMANN, 2009; F'GUYER; AFAQ; MUKHTAR, 2003; NICHOLS; KATIYAR, 2010; PÉREZ-SÁNCHEZ et al., 2014; PSOTOVA et al., 2006).

A atividade antioxidante dos extratos das folhas e inflorescências de *T. diversifolia* já é descrita na literatura (GAMA et al., 2014; SHYUR et al., 2005), sendo que esta atividade foi avaliada empregando-se ensaios *in vitro* baseados na capacidade dos componentes desses extratos em sequestrar radicais livres, como o DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) ou do radical superóxido (O_2^{2-}), em solução. Apesar do potencial antioxidante dos extratos de *T. diversifolia* e de sua composição rica em substâncias fenólicas, não há, até o presente momento, trabalhos que descrevam estudos para avaliação da atividade fotoprotetora desta espécie.

Como já mencionado, as LST são uma das principais classes de metabólitos secundários encontrados em *T. diversifolia*, sendo que grande parte das atividades biológicas descritas para os extratos desta planta são atribuídas a estas substâncias, inclusive a atividade anti-inflamatória. As LST estão presentes nas folhas e nas inflorescências do margaridão, sendo que muitas destas já tiveram suas estruturas determinadas, como em um estudo realizado por Ambrósio et al. (2008), que determinou a estrutura de várias delas, isoladas a partir das inflorescências de *T. diversifolia*.

Nos últimos anos foram publicados novos trabalhos relacionados à composição química e atividade biológica da espécie *T. diversifolia*, os quais acrescentam mais informações sobre a já citada espécie e que reforçam seu potencial científico e a aplicabilidade como fonte de novas entidades químicas com ações biológicas de interesse, tanto para área farmacêutica quanto para outras áreas como, por exemplo, a agricultura.

Recentemente, novos compostos foram isolados de extratos de *T. diversifolia*, tais como, três novas lactonas sesquiterpênicas (LST) e dois novos compostos (6-O-b-D-apiofuranosyl-trichocarpin e 1-heptade-4,6-diyne-3,10,16,17-tetraol-3-O-b-D-glucopyranoside) isolados a partir das partes aéreas de *T. diversifolia* (ZHAO et al., 2012a, 2012b), sendo que essas novas LST isoladas apresentaram atividade anti-hiperglicêmica *in vitro* (ZHAO et al., 2012a), o que demonstra que apesar de ser uma espécie já bastante estudada do ponto de vista fitoquímico, o margaridão ainda pode ser fonte de novas entidades químicas com interesse biológico e terapêutico.

Em recente trabalho Li et al., 2013 descrevem pela primeira vez a identificação dos monoterpenos: ((1S,2R,3R,5S)-2-hydroxymethyl-6,6-dimethylbicyclo[3.1.1]heptane-2,3-diol e (3R)-6,6-dimethyl-4-methylenebicyclo[3.1.1]heptane-1,3-diol-3-O-β-D-glucopyranoside; assim como de outras três substâncias já conhecidas, porém descritas pela primeira vez para esta espécie (sobrerol, (1R,2S,5S)-2,8-p-menth-diol e (1R,5S)-10-

hydroxyverbenon), todos isolados a partir das folhas de *T. diversifolia*, os quais apresentaram atividade *in vitro* sobre adipócitos 3T3-L1, aumentando a captação de glicose.

Novos dados sobre as atividades biológicas dos extratos de *T. diversifolia* também foram apresentados em trabalhos recentes, tais como, o estudo publicado por Juang et al. (2014), no qual é descrito o potencial dos extratos aquosos das folhas de *T. diversifolia* *in vitro* e *in vivo* na recuperação do dano associado à lesão medular em ratos, e que pode estar ligado ao potencial como sequestrante de espécies reativas de oxigênio (EROs), diminuindo assim o estresse oxidativo intracelular. Pode-se também destacar a atividade de compostos isolados de *T. diversifolia*, especialmente as lactonas sesquiterpênicas (LST), sobre *Leishmania braziliensis*, parasita causador da leishmaniose cutânea americana, de forma que estudos mais aprofundados utilizando estes constituintes químicos podem auxiliar na descoberta de novos tratamentos para esta doença (DE TOLEDO et al., 2014).

Além de novas atividades biológicas descritas para os constituintes químicos dos extratos de *T. diversifolia*, novos achados estão sendo feitos em relação a atividades já descritas para os extratos e substâncias isoladas desta planta, como o estudo realizado por Abe et al. (2015), no qual se propõe um mecanismo de ação para a atividade anti-inflamatória das tagitininas A, C e F *in vitro* sobre neutrófilos humanos, relacionado à inibição de citocinas pró-inflamatórias e do fator nuclear NF- κ B. A atividade citotóxica de algumas LSTs da classe das tagitininas, isoladas de *T. diversifolia*, sobre diferentes linhagens de células tumorais humanas HeLa e WiDR foi também descrita em trabalho recente, com destaque para a tagitinina C (WAHYUNINGSIH et al., 2015).

Recentemente Miranda et al. (2015) descreveram o isolamento e elucidação estrutural de duas novas LST a partir do extrato das folhas, além de outras substâncias já descritas na literatura para a espécie, demonstrando o potencial dessas substâncias como fitotoxinas, interferindo no desenvolvimento de outras plantas.

A aplicação de extratos de *T. diversifolia* na área agrícola vem sendo suportada por trabalhos que reportam a atividade tóxica dos extratos etanólicos das folhas sobre operárias de uma espécie de formiga cortadeira (*Atta cephalotes*), principalmente os extratos obtidos a partir das folhas secas a sombra, os quais foram capazes de causar uma taxa de mortalidade de até 97,5% entre as formigas operárias após um período de cinco dias de tratamento, sugerindo assim o potencial desta planta para o controle de pragas agrícolas (CASTAÑO-QUINTANA; MONTOYA-LERMA; GIRALDO-ECHEVERRI, 2013).

Uma vez que as LST, os ACG e os flavonoides apresentam-se como os principais responsáveis pelas atividades biológicas descritas para os extratos de *T. diversifolia*, torna-se

importante estudar o comportamento sazonal dessas classes de substâncias no vegetal. O margaridão apresenta-se como uma boa fonte para obtenção de substâncias aplicáveis nas áreas farmacêutica e agrícola, e visando tais aplicações, conhecer o comportamento de seus principais metabólitos ao longo de diferentes épocas do ano, a relação do metabolismo com os fatores do ambiente, e caso haja variação desses metabólitos, como a atividade biológica é afetada, são fatores importantes a serem estudados.

O estudo dos efeitos da sazonalidade sobre a produção de metabólitos em plantas com potencial para uso medicinal, por exemplo, é extremamente importante, ainda mais em plantas que podem ser utilizadas como matéria-prima na produção de medicamentos fitoterápicos, pesticidas e herbicidas naturais, uma vez que as substâncias responsáveis pelas atividades biológicas de extratos vegetais são produtos do metabolismo secundário da planta (SANTOS, 2007).

A sazonalidade é um dos principais fatores que interferem nos teores e composição dos constituintes químicos das plantas, sendo que na família Asteraceae, as LST, os ACG e os flavonoides têm sua produção no vegetal altamente influenciada pela sazonalidade, ou seja, amostras de uma mesma planta coletadas em diferentes épocas do ano podem apresentar diferenças em sua constituição química tanto do ponto de vista de composição quanto do teor de metabólitos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Associado ao fator sazonalidade é importante observar o efeito do ambiente sobre o metabolismo do vegetal, uma vez que qualquer tipo de mudança nas condições do local onde a planta se desenvolve pode alterar a homeostase metabólica da mesma (SHULAEV et al., 2008). Dessa forma, avaliar alguns fatores ambientais, tanto abióticos (ex.: temperatura, disponibilidade hídrica, condições do solo, luz/ritmo circadiano, gases atmosféricos) quanto bióticos (ex.: doenças/parasitismo, alelopatia, microrganismos terrestres), assim como o comportamento sazonal de tais fatores, é muito importante para compreender e explicar as variações sazonais que podem ocorrer nos metabólitos secundários em plantas como o margaridão (BUNDY; DAVEY; VIANT, 2009).

Além de avaliar o comportamento dos constituintes químicos de interesse na planta frente aos efeitos da sazonalidade, torna-se importante observar como a atividade biológica dos extratos obtidos dessas plantas é influenciada por esta variação. Alguns trabalhos demonstraram os efeitos da sazonalidade sobre a variação de compostos secundários em plantas medicinais da família Asteraceae (a mesma de *T. diversifolia*) como, por exemplo, o estudo realizado por Siatka e Kašparová (2010) que demonstrou variação nos teores de fenóis totais e flavonoides presentes nas flores de *Bellis perennis* L. e consequente variação na

atividade sequestrante de radicais livres dos extratos obtidos das flores deste vegetal. Um estudo sobre variação sazonal de constituintes químicos das folhas e flores de *T. diversifolia* e sua relação com a atividade antimicrobiana foi realizado por Silva (2004), no qual se observou variação na atividade antimicrobiana dos extratos da planta de acordo com a época do ano. Entretanto, estes estudos com essa abordagem com espécies da família Asteraceae ainda são raros e pouco detalhados.

Considerando a capacidade da espécie *T. diversifolia* de se adaptar a diferentes ambientes, baseando-se na sua ampla distribuição geográfica, e nas diferentes propriedades biológicas descritas para os metabólitos presentes em seus extratos, propôs-se o estudo da variação sazonal e da influência dos fatores ambientais sobre o perfil metabólico da espécie, através de uma abordagem de metabolômica ambiental, utilizando diferentes métodos analíticos, como a cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada a espectrometria de massas de alta resolução (UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS) e a ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H), para a seleção de extratos com maior potencial para atividades biológicas *in vitro*, tais como as atividades antioxidante e fotoprotetora, de forma a se estabelecer um modelo metabolômico para o estudo da relação ambiente-metabolismo-atividade biológica em plantas focado nos metabólitos que possuem propriedades biológicas interessantes.

2 OBJETIVOS

Com base no presente exposto, propôs-se como objetivo principal deste trabalho a realização de estudo de metabolômica ambiental com *Tithonia diversifolia*, a fim de se avaliar o efeito da sazonalidade e de fatores ambientais abióticos sobre o perfil metabólico das diferentes partes da planta (folhas, caules, raízes e inflorescências), e a realização de ensaios para avaliação das atividades antioxidante, fotoprotetora e fotoquimiopreventiva, *in vitro*, baseando-se na variação observada para o perfil metabólico destas partes.

Dentre os objetivos específicos, destacam-se:

1. Padronização do cultivo e do método de coleta das amostras de *T. diversifolia*;
2. Padronização do método de preparo dos extratos brutos (extratos aquosos) e de obtenção dos óleos essenciais das folhas e inflorescências;
3. Análise das amostras de *T. diversifolia* coletadas mensalmente, durante um período de 24 meses, por UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS e RMN ^1H uni e bidimensional (*J-resolved*) para avaliação da variação sazonal do perfil metabólico das diferentes partes do vegetal;
4. Análise da composição química e da variação sazonal dos óleos essenciais das folhas e inflorescências de *T. diversifolia* coletadas nos períodos de pré-antese, antese e pós-antese;
5. Análise da variação sazonal do perfil metabólico de amostras de *T. diversifolia* coletadas em diferentes locais do território brasileiro;
6. Análise da influência de fatores ambientais abióticos, como fatores climáticos (precipitação, umidade do ar, temperatura e radiação solar) e do solo (nutrientes minerais e outros parâmetros de fertilidade do solo), sobre a variação do perfil metabólico de *T. diversifolia*;
7. Desrepliação dos extratos em UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS utilizando biblioteca de substâncias puras;
8. Isolamento de componentes majoritários a partir dos extratos aquosos das folhas e inflorescências;
9. Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* de diferentes extratos, baseada na diferença dos perfis metabólicos;

10. Avaliação do potencial fotoprotetor e fotoquimiopreventivo *in vitro* dos extratos de *T. diversifolia*, baseada nos resultados da análise metabolômica e dos ensaios de atividade antioxidante.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção das Amostras

3.1.1 Obtenção e Preparo do Material Vegetal

Para a realização do estudo, foram utilizadas amostras coletadas tanto em condição *ex situ* quanto *in situ*. As amostras obtidas em condição *ex situ* são provenientes do cultivo de duas populações de *T. diversifolia*, cada uma composta de 48 indivíduos, estando uma população localizada no horto de plantas medicinais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, município de Ribeirão Preto, estado de São Paulo (Latitude: 21° 10' 07,4" S; Longitude: 47° 50' 49,1" O), e outra na Fazenda Santo Antônio, município de Pires do Rio, estado de Goiás (Latitude: 17° 12' 38,8" S; Longitude: 48° 18' 24,9" O). O cultivo foi realizado em dois estados, com intuito de se analisar a influência de diferentes ambientes sobre a homeostase metabólica do margaridão.

As coletas nas áreas de cultivo iniciaram-se no mês de abril de 2012, com espécimes de três meses de idade (a partir do início do plantio), e foram realizadas mensalmente pelo período de dois anos, sendo finalizadas no mês de março de 2014. O material coletado foi inicialmente dividido em dois grupos: material para estudo de sazonalidade e influência ambiental, e material para obtenção de extratos brutos (etapa de isolamento). O material destinado para estudo de sazonalidade e influência ambiental foi separado por órgão vegetal (folha, caule, raiz e inflorescência), acondicionado em sacos de papel devidamente identificados, congelados em gelo seco (-78 °C) logo após a coleta, seco em liofilizador e armazenado em refrigerador a -20 °C até o preparo dos extratos, seguindo procedimento descrito por Kim e Verpoorte (2010) com adaptações. O material destinado à obtenção de extratos brutos foi separado por órgão da planta (folhas e inflorescências), seco em estufa de circulação de ar a temperatura de 40 °C, e posteriormente separado por método de extração para cada órgão da planta (infusão e lavado rico em LST).

O material utilizado para a obtenção dos óleos essenciais foi coletado nos meses de janeiro, maio, junho, julho, agosto e dezembro de 2013, provenientes das duas populações cultivadas (Goiás e São Paulo) e foi armazenado em refrigerador (-20° C) até utilização posterior.

As amostras utilizadas para o preparo dos extratos destinados ao estudo da variação regional de *T. diversifolia* foram coletadas em condições *in situ* nas áreas urbanas dos municípios de Castanhal-PA (Latitude: 01° 18' 21,85" S; Longitude: 48° 0' 16,02" O), Florianópolis-SC, a partir do Horto didático para cultivo de espécies medicinais da

Universidade Federal de Santa Catarina (Latitude: 27° 35' 56,0" S; Longitude: 48° 31' 02,3" O) e Natal-RN, Bairro Capim Macio (Latitude: 05° 50' 50" S; Longitude: 35° 12' 00" O) e da área administrativa de Santa Maria-DF (Latitude: 16° 01' 09.74" S; Longitude: 47° 59' 24,5" O). Essas amostras foram coletadas e processadas da mesma maneira que aquelas obtidas a partir das áreas de cultivo e destinadas à realização do estudo de sazonalidade e influência dos fatores ambientais.

Exsicatas (subamostras do material coletado) de cada amostra coletada foram enviadas para o Herbário SPF do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, instituição fiel depositária credenciada ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e sob responsabilidade do curador Dr. Renato de Mello Silva, para fins de identificação e depósito. Os números de depósito para cada uma das exsicatas é: Sampaio #1 (amostra proveniente de Pires do Rio-GO), Sampaio #2 (amostra proveniente de Ribeirão Preto-SP), Sampaio #3 (amostra proveniente de Florianópolis-SC), Sampaio #4 (amostra proveniente de Castanhal-PA) e Sampaio #5 (amostra proveniente de Santa Maria-DF). A amostra coletada no município de Natal-RN foi depositada no Herbário da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, instituição que também é fiel depositária credenciada pelo CNPq, sob o número de depósito 15758, e o material foi identificado pelo botânico Msc. Alan Roque de Araújo.

3.1.2 Obtenção de Amostras de Solo e Dados Climáticos

As coletas de solo foram realizadas a cada seis meses, iniciando pelo mês de abril de 2012, seguindo procedimento padrão para coleta de amostras destinadas a análise de solos do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), o material foi acondicionado em sacos plásticos devidamente identificados e uma alíquota de 200 g de cada amostra foi separada e enviada para análise de macro e micronutrientes, enxofre e alumínio pela empresa Ribersolos, localizada na cidade de Ribeirão Preto-SP.

Os dados climáticos das áreas de coleta são obtidos através do banco de dados climáticos, disponível na página da internet do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), sendo que os dados consistem de: temperatura (°C), umidade (%), radiação (kJ/m²) e precipitação (mm). Os dados climáticos obtido são referentes ao período entre os meses de março de 2012 à março de 2014. Para a análise de dados e elaboração dos gráficos com o perfil climático dos dois anos de estudo foram utilizados as médias mensais da temperatura,

umidade e radiação, e apenas para a precipitação os dados foram utilizados como precipitação acumulada mensal.

3.2 Preparação dos Extratos e Extração do Óleo Essencial

3.2.1 Extratos Aquosos

Os extratos aquosos (infusos) de folhas e inflorescências de *T. diversifolia* foram obtidos pelo método descrito por Chagas-Paula et al. (2011). Os infusos das folhas (EAF) e inflorescências (EAI) foram obtidos da forma usual, ou seja, pela extração de uma determinada quantidade de material vegetal seco (100 g de cada parte da planta) com 1 L de água quente (aquecida até iniciar ebulição) por 30 minutos. Após o preparo dos extratos aquosos, ambos foram congelados em refrigerador -20°C e a água dos extratos foi removida por liofilização.

3.2.2 Obtenção do Óleo Essencial

Para realização da análise de variação sazonal dos componentes voláteis de *T. diversifolia*, os óleos essenciais das folhas e inflorescências provenientes das diferentes coletas realizadas no ano de 2013 foram obtidos a partir do material vegetal fresco pelo processo de hidrodestilação em aparelho de Clevenger. As amostras de óleos obtidas por esse processo foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar adequadamente fechados e armazenadas sob refrigeração.

3.3 Análise Fitoquímica dos Extratos

3.3.1 Análise dos Óleos Essenciais

Os óleos essenciais obtidos das folhas e inflorescências de *T. diversifolia* foram analisados em um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas modelo *Gas Chromatograph Mass Spectrometer - Shimadzu® - QP 2010*, utilizando uma coluna DB-5MS (30 m x 0,25 x 0,25 µm) da marca Agilent®, empregando o seguinte método para a análise cromatográfica: temperatura do forno de 60°C; temperatura de injeção de 250°C; modo de injeção *split*; fluxo na coluna de 1,30 mL/min; gás de arraste – nitrogênio (N₂); rampa de aquecimento de 60 à 240°C; taxa de aquecimento – 3°C/min; fonte de ionização – impacto eletrônico (EI).

Pela comparação dos tempos de retenção observados nas amostras e dos alcanos de série homóloga (C9 a C25), foi possível calcular o Índice de Retenção para cada componente dos diferentes óleos essenciais, utilizado para se realizar a identificação através da comparação dos espectros de massas obtidos com aqueles disponíveis nas seguintes bibliotecas de dados espectrais de massas: Flavors and Fragrances of Natural and Synthetic Compounds (FFNSC 1.3), Wiley Library, National Institute of Standards and Technology (NIST Webbook) e The Pherobase online.

3.3.2 Fracionamento do extrato aquoso das folhas (EAF) e isolamento de componentes majoritários

Para isolamento de componentes majoritários, 50 g de EAF foi ressuspenso em 200 mL de água e acidificado com solução aquosa de H_2SO_4 1M até pH 3,0. Posteriormente esse material foi particionado com 100 mL de acetato de etila (AcOEt) em funil de separação por três vezes, coletou-se a fração AcOEt do EAF (FAEAF), sendo o solvente evaporado em evaporador rotativo. A solução aquosa restante foi neutralizada com solução de NH_4OH 1M até pH 7,0, posteriormente particionada com 100 mL de *n*-butanol (n-BuOH) por três vezes, coletando-se a fração butanólica (FBEAF), sendo o solvente evaporado com auxílio de evaporador rotativo. A fração aquosa resultante do processo de partição (FAqEAF) foi congelada e a água removida por liofilização.

As três frações obtidas pela partição do EAF – FAEAF, FBEAF e FAqEAF – foram submetidas a diferentes técnicas cromatográficas, a fim de se isolar os componentes majoritários do extrato. Para a realização do isolamento e purificação dos componentes majoritários do EAF foram utilizadas as técnicas de cromatografia em camada delgada comparativa, cromatografia de exclusão por tamanho em gel de Sephadex[®] LH-20, cromatografia planar por centrifugação (Chromatotron 7924T[®] – T-Squared Technology, Inc.) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em escala semi-preparativa, utilizando o seguinte programa de eluição: bomba A – H_2O ; bomba B – MeOH; gradiente de eluição: 0 min: 15% B, 35 min: 100% B, 45 min: 100% B, 50 min: 15% B; fluxo da fase móvel: 10,0 mL/min; para análise foi utilizada uma coluna semi-preparativa Shim-pack PREP-ODS (H) KIT – 20 mm I.D. x 250 mm L., Shimadzu[®]).

A pureza cromatográfica das substâncias obtidas pela etapa de isolamento e purificação das frações do EAF foi determinada pelas técnicas de CCD comparativa e CLAE-UV-DAD, utilizando o seguinte programa de eluição: bomba A - H_2O (1% HAc); bomba B -

MeCN; gradiente de eluição: 0 min (0% B), 60 min (45% B), 65 min (100% B), 65 min (100% B), 70 min (0% B), 75 min (0% B); fluxo da fase móvel: 1,4 mL/min; para a análise foram utilizadas duas colunas monolíticas modelo Onix[®] C18, 3 mm I.D. x 100 mm L. (Phenomenex[®]) acopladas (GOBBO-NETO; LOPES, 2008).

3.3.3 Fracionamento do extrato aquoso das inflorescências (EAI) e isolamento de componentes majoritários

O EAI foi particionado através de cromatografia líquida a vácuo (CLV) utilizando celulose microcristalina como fase estacionária, seguindo procedimento descrito por Nascimento (2008). Para o fracionamento do EAI, 40 g do extrato foram ressuspensos com metanol e posteriormente incorporados a 50 g de celulose microcristalina, com auxílio de gral e pistilo. O material resultante foi transferido para uma coluna de vidro com filtro, adequada para CLV, o material foi coberto com papel de filtro e algodão e posteriormente particionado com os seguintes solventes, respectivamente: *n*-hexano (6 x 250 mL), diclorometano (6 x 250 mL), acetato de etila (6 x 250 mL), *n*-butanol (3 x 500 mL) e metanol/água 1:1 (3 x 500 mL).

A fração hexânica foi concentrada em evaporador rotativo logo após a primeira passagem do solvente pela coluna e o solvente recuperado foi utilizado para prosseguir o fracionamento do extrato, repetindo-se o procedimento por cinco vezes. O volume final da fração foi reduzido para 20 mL, transferido para um tubo de ensaio de 30 mL e seco em centrífuga de secagem a vácuo modelo Savant SPD 2010 SpeedVac Concentrator Thermo[®], obtendo-se ao final do processo a Fração Hexânica do Extrato Aquoso das Inflorescências de *T. diversifolia* (FHEAI) com massa igual a 19,5 mg. Para obtenção das frações diclorometano e acetato de etila realizou-se o mesmo procedimento utilizado para a obtenção da fração FHEAI, obtendo-se no final as seguintes frações: Fração Diclorometano do Extrato Aquoso das Inflorescências (FDEAI) com massa igual a 636,4 mg e Fração Acetato de Etila do Extrato Aquoso das Inflorescências (FAEAI) com massa igual a 1,5722 g.

Para obtenção das frações *n*-butanólica e metanol/água não foi feita a recuperação do solvente como para a obtenção das demais frações. A fração líquida obtida pelo fracionamento com *n*-butanol foi misturada com água destilada na proporção de 55,5:44,5 (v/v), concentrada em evaporador rotativo até todo *n*-butanol ser eliminado da mistura e a suspensão aquosa resultante foi então seca por liofilização, obtendo-se ao final a Fração Butanólica do Extrato Aquoso das Inflorescências (FBEAI) com massa de 1,3486 g.

A fração líquida obtida pelo fracionamento em coluna com metanol/água 1:1 foi concentrada em evaporador rotativo até a eliminação de todo o metanol do meio e a solução aquosa resultante foi posteriormente seca por liofilização, obtendo-se assim a Fração Aquosa do Extrato Aquoso das Inflorescências (FAqEAI) com massa de 14,0 g.

As frações obtidas a partir do EAI foram utilizadas para isolamento de compostos majoritários presentes no extrato. As frações FHEAI e a FDEAI não foram utilizadas para isolamento de compostos majoritários devido ao baixo rendimento em massa após o fracionamento (principalmente da FHEAI) e pelo fato do objetivo principal desta etapa fitoquímica ser o isolamento, purificação e elucidação de compostos de média a alta polaridade, por serem pouco descritos para a espécie estudada.

A fração FAEAI foi submetida à cromatografia de exclusão por tamanho em coluna de Sephadex LH-20[®], utilizando-se 1,0 g da fração e metanol como eluente. Foram coletadas 31 alíquotas, de 20 mL cada, da coluna de Sephadex LH-20, essas alíquotas foram secas e analisadas por cromatografia em camada delgada e posteriormente, aquelas semelhantes foram reunidas, obtendo-se ao final 13 sub-frações (FAEAI 1 a 13). As 13 sub-frações FAEAI foram analisadas em CLAE-UV-DAD, utilizando coluna analítica modelo Shim-pack PREP-ODS (H) KIT – 4.6 mm I.D. x 250 mm L., Shimadzu[®], utilizando diferentes programas de eluição para cada subfração:

1. Programa de eluição para a subfração FAEAI 3: bomba A – H₂O (1% Ác. Fórmico), bomba B – MeCN; gradiente de eluição: 0 min (10% B), 10 min (10% B), 40 min (35% B), 55 min (100% B), 65 min (100% B), 70 min (10% B); fluxo da fase móvel: 0,8 mL/min.
2. Programa de eluição para a subfração FAEAI 4: bomba A – H₂O (1% Ác. Fórmico), bomba B – MeCN, bomba C – MeOH; gradiente de eluição: 0 min (6% B e 4% C), 20 min (21% B e 14% C), 30 min (21% B e 14% C), 40 min (30% B e 20% C), 50 min (60% B e 40% C), 60 min (60% B e 40% C), 65 min (6% B e 4% C); fluxo da fase móvel: 0,8 mL/min.
3. Programa de eluição para a subfração FAEAI 5: bomba A – H₂O (1% Ác. Fórmico), bomba B – MeCN; gradiente de eluição: 0 min (20% B), 10 min (20% B), 25 min (30% B), 40 min (50% B), 50 min (100% B), 60 min (100% B), 65 min (20% B); fluxo da fase móvel: 0,8 mL/min.

Após as análises dos cromatogramas obtidos, as sub-frações FAEL 3 (331,3 mg), FAEL 4 (396,5 mg) e FAEL 5 (223,0 mg) foram submetidas a cromatografia líquida de alta eficiência semi-preparativa (coluna semi-preparativa Shim-pack PREP-ODS (H) KIT – 20 mmI.D. x 250 mmL, Shimadzu, programa de eluição igual ao citado anteriormente para cada subfração, respectivamente, com fluxo da fase móvel de 10,0 mL/min) para isolamento e purificação dos compostos majoritários presentes.

3.3.4 Identificação e elucidação estrutural das substâncias isoladas

As substâncias isoladas obtidas nas etapas anteriores foram submetidas à análise de ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas de alta resolução a fim de se realizar a identificação e/ou elucidação estrutural das mesmas.

As amostras foram submetidas a análises de RMN unidimensional de hidrogênio (^1H) e bidimensional HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Correlation*) e HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) – para determinação das correlações $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$; em 400 MHz, utilizando um aparelho modelo Bruker® - Avance DRX₄₀₀. Os solventes utilizados para análise das substâncias foram o metanol- d_4 , clorofórmio- d e o óxido de deutério (D_2O), de acordo com a solubilidade de cada substância. Os espectros de RMN obtidos para as substâncias foram analisados pelo software MestReNova versão 9 (Mestrelab Research®), e os dados obtidos utilizados para elucidação estrutural.

As análises de espectrometria de massas de alta resolução foram realizadas por injeção direta, utilizando-se 1 mg de cada substância, em um equipamento Bruker Daltonics microTOF-Q II™ ESI-Qq-TOF, sendo que as amostras foram solubilizadas em metanol (grau HPLC) ou água ultra pura (Milli-Q® - Merck Millipore®) de acordo com a solubilidade de cada uma.

A identificação das substâncias isoladas se baseou na comparação dos dados obtidos pelos espectros de RMN, pelo valor da massa acurada e dos espectros de fragmentação, com dados disponíveis na literatura e banco de dados de substâncias.

3.4 Análise da variação sazonal e influência ambiental

3.4.1 Preparo dos extratos para análise por UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS

Para o preparo dos extratos utilizados tanto para análise da variação sazonal quanto da variação regional dos metabólitos de *T. diversifolia* e a influência dos fatores

ambientais, as amostras de material vegetal (folhas, caule, raiz e inflorescências), após o processo de secagem por liofilização, foram pulverizadas em trituradora de análise modelo IKA 11 Basic, o pó resultante foi tamisado em tamis tamanho 42 mesh (abertura: 0.355 mm) e após esta etapa, o material foi acondicionado em micro tubos de plástico e armazenado em congelador a -20°C .

Para cada amostra, 100 mg de pó foi pesado em micro tubo de plástico, adicionou-se 2 mL de etanol 70% (v/v) e realizou-se a extração em banho de ultrassom por 20 minutos. Após o procedimento de extração, o material foi centrifugado em microcentrífuga por 3 minutos a 130000 rpm, o sobrenadante foi então filtrado em filtro para seringa (0,22 μm de diâmetro do poro), a solução filtrada foi então particionada com hexano 95% (grau HPLC) para retirada de material graxo e pigmentos (etapa de *clean up*), posteriormente centrifugada novamente, e a partição hexânica de cada amostra foi descartada. O material livre de graxas foi então seco em centrífuga de secagem a vácuo, obtendo-se ao final os extratos utilizados para análise da variação sazonal dos metabólitos secundários de *T. diversifolia* e influência dos fatores ambientais.

Para o preparo das amostras analisadas por UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS, os extratos obtidos foram dissolvidos em água/acetonitrila (7:3) na concentração de 1,0 mg/mL, as soluções obtidas foram então filtradas através de filtro para seringa (0,22 μm) e utilizadas para análise em UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS. Uma amostra contendo apenas o solvente água/acetonitrila (7:3) foi utilizada como branco a fim de se eliminar a interferência do solvente na etapa de processamento dos dados. Também foi preparada uma amostra contendo uma mistura de extratos (folhas, caules, raízes e inflorescências), a qual foi utilizada como referência para realizar a etapa de alinhamento dos cromatogramas durante o processamento dos dados.

3.4.2 Preparo dos extratos para análise por RMN ^1H e *J-resolved*

Os extratos de *T. diversifolia* utilizados para a análise por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio (^1H) e bidimensional do tipo *J-resolved*, em um total de 170 amostras, foram transportados para a Universidade de Strathclyde, localizada na cidade de Glasgow, Reino Unido, de acordo com autorização do CNPq nº 010319/2013-1 e aprovada pelo ofício COAPG nº 182/2014.

Para o preparo das amostras, pesou-se 5,0 mg de cada extrato em frascos de vidro, dissolveu-se em 650 µL de uma mistura metanol- d_4 /D₂O (60:5) e transferiu-se para tubos de RMN com 5 mm de diâmetro, os quais foram utilizados para a realização das análises.

3.4.3 Análise dos extratos de *T. diversifolia* por UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS

Os extratos destinados ao estudo de variação sazonal dos metabólitos secundários e influência dos fatores ambientais foram analisados por UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS em um cromatógrafo líquido de ultra alta eficiência modelo Thermo[®] Accela, com sistemas de bombas modelo *Accela 1250 pump*, acoplado a um detector de arranjo de diodos modelo *Accela PDA detector* e a um espectrômetro de massas modelo Thermo[®] Exactive Plus com analisador do tipo Orbitrap[®].

A análise cromatográfica dos extratos foi realizada em uma coluna analítica ACE[®] (3 mm I.D. x 150 mm L.) com tamanho de partícula de 3 µm, mantida a 35°C em forno, com o seguinte programa de eluição: bomba A – H₂O (0,1% Ácido Fórmico), bomba B – MeCN (0,1% Ác. Fórmico); gradiente – 0 min (5% B), 10 min (20% B), 15 min (25% B), 25 min (45% B), 30 min (100% B), 38 min (100% B), 44 min (5% B); fluxo da fase móvel: 400 µL/min.

O método de ionização utilizado no espectrômetro de massas foi a ionização por *electron-spray* nas seguintes condições: voltagem do *spray* (modo positivo – 3,6 kV; modo negativo 3,2 kV); temperatura do capilar (modo positivo – 300°C; modo negativo – 320°C). O analisador utilizado foi do tipo Orbitrap[®].

3.4.4 Análise dos óleos essenciais por CG-EM

Os óleos essenciais obtidos das folhas e inflorescências de *T. diversifolia* foram analisados em um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas modelo *Gas Chromatograph Mass Spectrometer - Shimadzu[®] - QP 2010*, utilizando uma coluna DB-5MS (30 m x 0,25 x 0,25 µm) da marca Agilent[®], empregando o seguinte método para a análise cromatográfica: temperatura do forno de 60°C; temperatura de injeção de 250°C; modo de injeção *split*; fluxo na coluna de 1,30 mL/min; gás de arraste – nitrogênio (N₂); rampa de aquecimento de 60 à 240°C; taxa de aquecimento – 3°C/min; fonte de ionização – impacto eletrônico (EI).

Através dos tempos de retenção observados nas amostras e dos alcanos de série homóloga (C9 a C25), foi possível calcular o Índice de Retenção do Kovats para cada componente dos diferentes óleos essenciais, utilizado para se realizar a identificação através da comparação dos espectros de massas obtidos com os disponíveis nas seguintes bibliotecas de dados espectrais de massas: Flavors and Fragrances of Natural and Synthetic Compounds (FFNSC 1.3), Wiley Library, National Institute of Standards and Technology (NIST Webbook) e The Pherobase online

3.4.5 Análise dos extratos por RMN bidimensional (*J-resolved*)

Os extratos destinados ao estudo de variação sazonal dos metabólitos secundários e influência dos fatores ambientais por RMN de hidrogênio e *J-resolved* foram analisados no *Strathclyde Institute of Pharmacy and Biomedical Sciences* (SIPBS) da Universidade de Strathclyde, utilizando um aparelho de 400 MHz modelo Jeol-LA400 FT-NMR *spectrometer system* equipado com uma *probe* 40TH5AT/FG (JEOL®, Tokyo, Japan).

A aquisição de espectros de prótons unidimensional (RMN ^1H) foi realizada por meio de uma sequência de pulsos de pré-saturação utilizando 16 *scans* por análise. Posteriormente, espectros de RMN bidimensionais do tipo *J-resolved* também foram adquiridos utilizando-se 32 *scans* por análise com 64 incrementos por *scan*. Os pontos de dados foram coletados em um *plot* usando as larguras espectrais de 3,56 kHz para F2 (eixo do deslocamento químico) e 50 Hz para F1 (eixo das constantes de acoplamento spin-spin). O método de pré-saturação foi usado para suprimir o sinal do solvente durante a aquisição e os espectros bidimensionais do tipo *J-resolved* permitiram a separação da sobreposição dos valores de deslocamento químico (δ) em relação às constantes de acoplamento (J) correspondentes em diferentes eixos.

3.4.6 Análise de variação regional dos metabólitos de *T. diversifolia*

A análise da variação regional dos metabólitos de *T. diversifolia* foi realizada por UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS, seguindo o mesmo procedimento descrito para os extratos utilizados no estudo da variação sazonal e influência dos fatores ambientais, de acordo com o item 3.4.3.

3.5 Processamento dos dados obtidos para análise multivariada

3.5.1 Dados obtidos por UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS

Os dados obtidos após a análise dos extratos de *T. diversifolia* por UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS (tanto para análise de variação sazonal e influência dos fatores ambientais quanto para a análise de variação regional dos metabólitos) foram processados por diferentes softwares para que se pudesse realizar a análise estatística adequada.

Primeiramente, uma vez que o espectrômetro de massas utilizado é capaz de realizar a aquisição de dados nos modos positivo e negativo simultaneamente, os dados obtidos para cada extrato tiveram de ser separados de acordo com o modo de ionização e os arquivos de dados convertidos para o formato mzXML, sendo todas essas etapas realizadas através do software MSConvert do pacote ProteoWizard 3.0.6002.

Após a separação dos dados de acordo com o modo de ionização e subsequente conversão para o formato mzXML, os mesmos foram processados no software MZmine 2.10 (um modo de ionização de cada vez) a fim de se realizar as etapas de: detecção dos picos, filtro de picos, construção dos cromatogramas, deconvolução dos cromatogramas, agrupamento de picos isotópicos, alinhamento dos cromatogramas, preenchimento de falhas nos cromatogramas, busca por adutos e identificação dos picos utilizando banco de dados de substâncias. Dentre os parâmetros utilizados para o tratamento de dados no MZmine 2.10, destacam-se: nível de ruído – 10^6 ; função para o formato do pico – Lorentziana; altura mínima do pico – 5×10^6 ; e tolerância de m/z – 0,002 m/z ou 5,0 ppm.

Os dados tratados no software mzMine 2.10 foram exportados na forma de tabelas contendo as áreas dos pico, tempo de retenção e massa exata para cada extrato analisado, sendo uma tabela para os dados obtidos no modo de aquisição positivo e outra para os dados do modo negativo. Estas tabelas foram utilizadas para a análise estatística multivariada dos dados.

Antes de se realizar a análise multivariada, os dados obtidos para análise da variação regional foram centrados na média e escalonados pelo método de Pareto (Equação 1). Esta etapa foi realizada para normalizar e escalonar os dados, a fim de se realizar a análise multivariada.

$$\hat{x}_n = \left(\frac{x_n - \bar{x}}{\sqrt{DP}} \right)$$

Equação 1. Fórmula para escalonamento de variáveis pelo método de Pareto. Legenda: $\hat{x}_n$ = valor da variável escalonada; x_n = valor da variável; $\bar{x}$ = média da variável; DP = Desvio padrão da variável.

3.5.2 Processamento dos dados obtidos por RMN

Os dados obtidos pela análise por RMN ^1H e *J-resolved* foram processados pelo software MestreNova versão 8 para posterior análise multivariada.

Primeiramente, todos os espectros de ^1H obtidos no modo de pré-saturação e os espectros das projeções unidimensionais do *J-resolved* foram agrupados (*stacked*) e processados no modo *Active spectrum* (espectro ativo).

A primeira etapa do processamento consistiu na correção da linha de base pelo método de Whittaker Smoother, apodização através da função gaussiana (Valor = 1 GB [Hz]), normalização (com maior sinal equivalente a 100), suavização (*smoothing*) dos espectros pelo método de Savitzky-Golay, o *binning* (etapa para definir o intervalo em ppm para a integração das intensidades) para o espectro completo, usando um valor de 0,01 ppm, e por fim uma segunda normalização.

Os dados obtidos pela análise do tipo *J-resolved* foram primeiramente simetrizados e inclinados (*tilted*) em 45° (a fim de se retirar o efeito da constante de acoplamento sobre o eixo com os valores de deslocamento químico), e em seguida foram obtidas as projeções unidimensionais para o eixo contendo os valores de deslocamento químico dos espectros. Os espectros obtidos pela projeção unidimensional foram então processados seguindo os mesmos passos descritos para os espectros de ^1H .

Os dados processados no MestreNova versão 8 foram exportados na forma de tabelas contendo as intensidades dos sinais para cada deslocamento químico em intervalos de 0,01 ppm. Para os dados dos espectros de ^1H , foram utilizados valores de deslocamento químico na faixa compreendida entre 0,5 à 9,25 ppm, e para os espectros de *J-resolved* na faixa entre 0,5 à 8,9 ppm. Os valores de deslocamento químico referentes aos sinais do solvente (metanol- d_4 e D_2O) foram manualmente removidos no software Excel.

3.5.3 Processamento dos dados ambientais

Os dados ambientais referentes aos nutrientes minerais do solo e dados climáticos dos dois locais de estudos foram transformados de acordo com o tipo de dado, sendo que aqueles expressos em porcentagem foram transformados pela fórmula descrita na Equação 2, e os demais dados pela fórmula descrita na equação 3. A transformação dos dados foi realizada para normalizar e escalonar os dados, a fim de se realizar a análise multivariada. Os valores referentes a variável pH não foram escalonados.

$$\hat{x}_n = \arcsen \left(\sqrt{\frac{x_n}{100}} \right)$$

Equação 2. Fórmula para transformação de variáveis pelo método do arco seno. Legenda: $\hat{x}_n$ = valor da variável transformada; x_n = valor da variável.

$$\hat{x}_n = \log_{10}(x_n + 1)$$

Equação 3. Fórmula para transformação logarítmica de variáveis. Legenda: $\hat{x}_n$ = valor da variável transformada; x_n = valor da variável.

3.5.4 Análise multivariada dos dados de RMN combinados com os dados de UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS

Os dados espectrais obtidos pela análise de RMN bidimensional do tipo *J-resolved*, para o estudo da variação sazonal e influência dos fatores do ambiente, foram combinados com aqueles previamente obtidos por UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS, utilizando-se o método de concatenação para fusão de dados espectrais (FORSHED; IDBORG; JACOBSSON, 2007).

Os dois conjuntos de dados (não escalonados), foram divididos em dois blocos de acordo com o tipo do dado (UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS e RMN *J-resolved*), então, cada bloco foi escalonado pela fórmula descrita na Equação 4, onde x é o valor da área do pico (UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS) ou a intensidade do sinal (RMN) para cada observação em uma dada variável, e $\Sigma\sigma$ é a somatória de todos os desvios padrões para cada bloco. Após o procedimento de escalonamento, os dois blocos foram combinados em uma única matriz de dados (para cada parte da planta), que foi submetida à análise multivariada adequada.

Os dados obtidos para o estudo da variação sazonal dos metabólitos de *T. diversifolia* e influência dos fatores ambientais (dados obtidos por UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS, RMN, clima e solo), após o tratamento adequado, foram analisados nos softwares CANOCO[®] 4.5 (Biometris – Plant Research International[®]), OriginPro[®] 9.6 e SIMCA-P[®] (Umetrics[®]).

Os dados foram divididos em dois conjuntos de variáveis (Variáveis químico-orgânicas – dados concatenados obtidos da análise dos extratos de *T. diversifolia*; e Variáveis ambientais – dados climáticos e obtidos a partir das análises de solo) e estas variáveis foram utilizadas para a realização dos seguintes métodos de estatística multivariada: Análise de Componentes Principais (PCA), Análise Hierárquica de *Clusters* (HCA) pelo método de Ward (WARD, 1963) e *Orthogonal partial least squares discriminant analysis* – (OPLS-DA). Os métodos de análise multivariada utilizados são métodos de ordenação não supervisionados (PCA e HCA) e supervisionados (OPLS-DA), com o objetivo de diminuir a dimensionalidade do conjunto de dados de forma a buscar explicar a variação total do sistema e agrupar as amostras de acordo com seu perfil químico.

$$\hat{x}_n = \frac{x_n}{\sum DP_{bloco}}$$

Equação 4. Fórmula de escalonamento de variáveis para fusão de dados pelo método de concatenação. Legenda: $\hat{x}_n$ = valor da variável escalonada; x_n = valor da variável; DP_{bloco} = Desvio padrão do bloco de variáveis – UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS ou RMN (*J-resolved*).

3.5.5 Análise multivariada dos dados obtidos para o estudo da variação regional dos metabólitos de *T. diversifolia*

Os dados para o estudo da variação regional dos metabólitos secundários de *T. diversifolia* obtidos por UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS, após a etapa de processamento, foram submetidos aos seguintes métodos de análise: Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise Hierárquica de *Clusters* (HCA) pelo método de Ward (WARD, 1963); utilizando-se os mesmos softwares já citados no item anterior para a realização destas análises.

3.5.6 Análise multivariada dos dados obtidos por CG-EM

Os dados obtidos pela análise dos OE por CG-EM foram primeiramente utilizados para o cálculo do Índice de Retenção (IR) de cada pico obtido nos cromatogramas pela equação de Van Den Dool & Kratz (DOOL; KRATZ, 1963). Após o cálculo do IR para todos os cromatogramas, foi realizada a identificação dos picos baseada nos padrões de fragmentação de cada pico e de seus IRs por comparação com os dados de diferentes bibliotecas de substâncias, como Willey, FFNSC, Nist e Pherobase.

Após a identificação dos picos, os dados foram organizados em uma tabela contendo o IR, o nome (quando identificada) e a proporção (em %) de cada substância para todos os OE analisados.

Os dados expressos em porcentagem foram transformados pela fórmula $\arcsen(\sqrt{x/100})$, sendo x o valor da proporção (%) de cada pico no cromatograma. A transformação dos dados foi realizada para normalizar e escalonar os dados, a fim de se realizar a análise multivariada.

3.6 Desreplicação dos extratos por UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS

Os dados obtidos para os diferentes extratos de *T. diversifolia*, após a análise por UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS, foram utilizados na etapa de desreplicação baseada na massa exata, obtida pelo espectro de massa de alta resolução, sendo esta etapa realizada no software MZmine 2.10, através da comparação das massas acuradas e dos perfis de absorção no UV/Vis dos picos obtidos para os extratos com os seguintes bancos de dados de substâncias: LiNPA (Library of Natural Products from Asteraceae), TitDB (Tithonia Database) e *Dictionary of Natural Products* (<http://dnp.chemnetbase.com/>).

Além da comparação das massas exatas com os bancos de dados, foi utilizada também, para o processo de desreplicação dos extratos, a comparação dos espectros de massa, de absorção no UV/Vis e tempo de retenção com alguns padrões analisados sob as mesmas condições por UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS.

3.7 Avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

3.7.1 Seleção dos extratos para o ensaio de atividade antioxidante pelo ensaio do DPPH

Para o ensaio de atividade antioxidante foram utilizados 24 extratos de *T. diversifolia* selecionados a partir da proposta de agrupamento baseada na análise estatística

multivariada dos dados concatenados provenientes das análises por UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS e RMN do tipo *J-resolved*.

Os critérios para a seleção das amostras que foram avaliadas nos ensaios de atividade sequestrante de radicais livres pelo método do DPPH foram: a classe de metabólitos majoritários em cada grupo de amostras proposto e o índice de dissimilaridade das amostras dentro de cada grupo (sendo escolhidas aquelas amostras com o menor valor para este índice). Seguindo os critérios já descritos, selecionaram-se amostras das diferentes partes da planta, as quais foram utilizadas para a realização do ensaio de avaliação da atividade sequestrante de radicais livres pelo método do DPPH.

3.7.2 Ensaio de atividade sequestrante de radicais livres pelo método do DPPH

A avaliação da atividade antioxidante dos extratos de *T. diversifolia* foi realizado de acordo com o método descrito por Brand-Williams et al. (1995) e adaptado por Rufino et al. (2007). O método é baseado na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) por antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorbância a 515 nm (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995).

Para a realização do ensaio do DPPH, primeiramente, foi preparada uma solução estoque de DPPH na concentração de 0,06 mM, dissolvendo-se 2,4 mg do reagente DPPH em álcool metílico P.A., completando-se o volume para 100 mL em balão volumétrico.

A solução estoque de DPPH foi utilizada para o preparo de seis soluções em concentrações crescentes de 0,01 a 0,06 mM de DPPH e estas soluções foram então utilizadas para a determinação da curva padrão de DPPH. Para a determinação da curva padrão de DPPH cada uma das soluções preparadas a partir da solução estoque teve sua absorbância medida em espectrofotômetro a 515 nm, utilizando-se álcool metílico como branco, sendo que todas as leituras foram realizadas em triplicata para cada solução. Os valores de absorbância obtidos para cada concentração de DPPH foram utilizados para determinação da curva padrão de DPPH e obtenção da equação da reta pelo método de regressão linear.

Para a determinação da atividade antioxidante foram preparadas para cada amostra soluções na concentração de 3,0 mg/mL e a partir destas soluções foram preparadas cinco diluições concentrações crescentes, de acordo com cada extrato. A determinação da atividade antioxidante das amostras foi realizada transferindo-se 50 µL de cada uma das diluições dos extratos para microtubo de 5,0 mL e em seguida adicionando-se 1,95 mL da solução estoque de DPPH 0,06 mM. Um controle foi preparado transferindo-se 50 µL de

álcool metílico para o microtubo e em seguida adicionando-se 1,95 mL da solução estoque. As amostras e o controle foram deixados em repouso ao abrigo da luz por 30 minutos e após esse tempo tiveram suas absorbâncias medidas em espectrofotômetro a 515 nm, utilizando-se álcool metílico como branco, sendo que todas as leituras foram realizadas em triplicata para cada solução.

3.7.3 Determinação da atividade antioxidante sobre a enzima xantina oxidase (XOD) por quimiluminescência com oxidação do luminol

A partir dos resultados obtidos com o ensaio de avaliação da atividade sequestrante de radicais livres pelo método do DPPH, selecionou-se os melhores extratos para a realização do ensaio de determinação da atividade antioxidante sobre a enzima xantina oxidase (XOD) por quimiluminescência com oxidação do luminol. O critério utilizado para a seleção dos extratos que foram avaliados pelo ensaio de quimiluminescência foi o valor do PAR, sendo que foram selecionados aqueles extratos com valor de PAR superior a 0,1.

O ensaio para determinação da atividade antioxidante sobre a enzima xantina oxidase (XOD) por quimiluminescência com oxidação do luminol *in vitro* foi realizado de acordo com metodologia descrita por Girotti et al. (2000). Este ensaio baseia-se na medição da quimiluminescência gerada no sistema xantina/xantina oxidase (XOD)/luminol. Nesse sistema, a enzima xantina oxidase (XOD), na presença de oxigênio, reage com seu substrato xantina, produzindo ácido úrico e o radical superóxido, que oxida o luminol (Figura 1), que se rearranja passando para seu estado de excitação (SANTOS; SANTOS, 1992).

Para a realização deste ensaio as amostras foram dissolvidas em água na concentração de 1,0 mg/mL e a partir destas soluções iniciais, foram preparados cinco diluições para cada amostra avaliada. Em tubos de ensaio, pipetou-se 400 µL de tampão glicina 100 mM (em EDTA 1,0 mM, pH 9,4), 150 µL de solução de xantina 6,0 mM, 10 µL de cada diluição das amostras, 10 µL de solução de luminol 0,6 mM e 100 µL de solução de XOD 20 mU/mL. Agitou-se rapidamente e realizou-se a leitura em luminômetro modelo AutoLumat® LB 953 Multi-Tube Luminometer. O tampão glicina foi utilizado como branco. Todas as leituras foram realizadas em triplicata para cada amostra.

Os valores de emissão de luminescência obtidos para o branco e cada uma das diluições das amostras foram utilizados para a determinação da inibição da luminescência (em porcentagem) através da fórmula: $I = (1 - L_A/L_0) \times 100$; onde I é a porcentagem de inibição da

luminescência, L_A é o valor de emissão de luminescência para cada amostra e L_0 da emissão de luminescência para o branco.

Os valores de CE_{50} (concentração efetiva da amostra necessária para reduzir em 50% a emissão de luminescência no meio) para cada amostra foram obtidos através de equação da reta obtida através da regressão linear entre os valores das concentrações finais de cada amostra testada (nas diferentes diluições) e as porcentagens de inibição de emissão da luminescência para cada uma dessas concentrações.

3.7.4 Determinação da atividade inibidora da peroxidação lipídica *in vitro*

O ensaio para a avaliação da atividade inibidora da peroxidação lipídica *in vitro* foi realizado com as mesmas amostras avaliadas no ensaio para determinação da atividade antioxidante sobre a enzima xantina oxidase (XOD) por quimiluminescência, através da determinação do conteúdo de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), utilizando a gema de ovo como substrato lipídico (COSTA et al., 2012; GUIMARÃES et al., 2010; SILVA et al., 2007).

Para a realização deste ensaio as amostras foram dissolvidas em água na concentração de 2,0 mg/mL e a partir destas soluções iniciais, foram preparados cinco diluições para cada amostra avaliada. Inicialmente preparou-se o homogenato de gema de ovo (10% p/v) em solução de tampão fosfato 20 mM (pH 7,4). Para a indução da peroxidação lipídica, adicionou 1,0 mL do homogenato de gema de ovo, 100 μ L das amostras nas diferentes concentrações e 100 μ L de solução de sulfato de ferro (II) 0,07 M em microtubos, os quais foram mantidos em estufa a 37°C por 30 minutos. Um controle branco foi preparado da mesma forma, apenas adicionando-se água no lugar da amostra. As amostras e o controle foram preparados em triplicata.

Após o período de 30 minutos, deixou-se os microtubos resfriarem até temperatura ambiente e uma alíquota de 500 μ L de cada amostra e também do controle foram transferidos para outros microtubos contendo 1,0 mL de uma solução de ácido tricloroacético 15% em HCl 0,25 M. As amostras e o controle foram centrifugados a 1200 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação uma alíquota de 500 μ L do sobrenadante de cada microtubo foi transferida para tubos de ensaio contendo 500 μ L de uma solução de ácido tiobarbitúrico 0,67% em HCl 0,1 M. Os tubos de ensaio foram então levados para aquecimento em banho-maria a 95°C por 30 minutos. Ao final dos 30 minutos os tubos foram retirados para

resfriarem até atingirem temperatura ambiente e a absorbância do conteúdo de cada um deles foi obtida através de espectrofotômetro, no comprimento de onda de 532 nm.

A porcentagem de inibição da peroxidação lipídica para cada amostra foi determinada comparando-se as absorbâncias das amostras com o controle através da fórmula: $I = (1 - Ab_A / Ab_0) \times 100$; onde I é a porcentagem de inibição da peroxidação lipídica, Ab_A é a absorbância de cada amostra e Ab_0 é a absorbância do controle branco.

Os valores de CE_{50} (concentração efetiva da amostra necessária para reduzir em 50% a peroxidação lipídica) para cada amostra foram determinados pela equação da reta obtida através da regressão linear entre os valores das concentrações finais de cada amostra testada (nas diferentes diluições) e as porcentagens de inibição de peroxidação lipídica para cada uma dessas concentrações.

3.8 Ensaios para avaliação da fotoproteção e fototoxicidade dos extratos de *T. diversifolia* em cultura de células

Os extratos selecionados após a realização dos ensaios de atividade antioxidante foram utilizados para a realização dos ensaios para avaliação da fotoproteção e fototoxicidade *in vitro* utilizando-se cultura de células.

3.8.1 Manutenção da cultura de células

As linhagens celulares imortalizadas utilizadas foram de fibroblastos de camundongo L929 e de queratinócitos humanos HaCaT (cedidas pela Dra. Maria José Vieira Fonseca, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP).

Os fibroblastos L929 e os queratinócitos HaCaT foram cultivados em garrafas de cultivo de 150 cm², utilizando-se meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium-Sigma[®]) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF).

Para manutenção das células de linhagem imortalizada, estas foram submetidas a ação da enzima tripsina 0,25% (Gibco[®]) à 37° C por 2 min para a linhagem L929 e por 8 minutos para a linhagem HaCaT, sempre que a confluência celular atingisse 90%, de modo que o excesso de células foi transferido para uma nova garrafa de cultivo ou descartado. Ambas as células foram mantidas em incubadora de CO₂, em 37°C e 5% de CO₂ (Thermo[®] HEPA 100).

3.8.2 Avaliação da toxicidade celular (*in vitro*) pelo ensaio de incorporação do Vermelho Neutro

O ensaio de toxicidade celular foi realizado em microplacas de 96 poço com fundo chato, em uma concentração 4×10^4 células por poço. Após a transferência das células para as microplacas, as mesmas foram mantidas em incubadora de CO₂, a 37°C e 5% de CO₂ (Thermo® HEPA 100), por 24 horas utilizando-se DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) para ambas as linhagens.

Após as 24 horas de adaptação, o meio de cultura foi retirado e 180 µL de meio DMEM foram adicionados. Aos grupos tratados foram adicionados 20 µL de extrato em diferentes concentrações e aos dois grupos controles foram adicionado 20 µL do diluente DMSO 5% em solução salina de NaCl 0,9%. A toxicidade celular foi avaliada após 24 horas do início do tratamento através do ensaio de toxicidade celular descrito por Borenfreund e Puerner (1985), com a viabilidade celular expressa em porcentagem.

3.8.3 Avaliação *in vitro* da eficácia fotoprotetora dos extratos por medida da viabilidade das células expostas à radiação UV-B

A viabilidade das células de fibroblasto L929 e queratinócito HaCaT, expostas a radiação UV-B foi realizada de acordo com procedimento descrito por Figueiredo et al. (2014), utilizando-se placa de cultivo celular de 6 poços, com fundo chato e uma concentração de 8×10^5 células por poço. As células foram irradiadas sob placas de quartzo ao invés de vidro, pois o quartzo é transparente ao comprimento de onda da radiação UV-B utilizado neste experimento.

Para a realização deste ensaio, pesou-se 50,0 mg de cada extrato e dissolveu-se em 150 µL de DMSO, de forma que após a dissolução dos extratos, os mesmos foram incorporados a 1,0 g do veículo utilizado (base de silicone - CRODA®). Ambas as linhagens celulares foram expostas a uma dose de radiação UV-B de 0,5 J/cm², sendo que para cada linhagem testada, foram preparados os seguintes controles: irradiado, não irradiado, do veículo e um controle positivo utilizando um protetor solar comercial da marca Sundown® com fator de proteção solar (FPS) igual a 30.

A medida da viabilidade celular foi realizada pelo método de incorporação do Vermelho Neutro.

3.8.4 Avaliação *in vitro* da eficácia fotoprotetora dos extratos por medida da quantidade de espécies reativas de oxigênio (EROs) induzidas pela exposição à radiação UV-A

A avaliação da eficácia fotoprotetora dos extratos sobre células de fibroblasto L929 e queratinócito HaCaT expostas a radiação UV-A foi realizada de acordo com procedimento descrito por Wang e Joseph (1999), baseando-se na medida da quantidade de EROs produzidas pelas linhagens celulares expostas à radiação UV-A usando o ensaio da diclorofluoresceína acetato (DCFH-DA).

Para a realização deste ensaio os extratos foram preparados da mesma forma que para o ensaio de fotoproteção UV-B (item 3.8.3) e a dose de radiação UV-A utilizada para ambas as linhagens celulares foi de $10,0 \text{ J/cm}^2$. O controle irradiado, não irradiado, do veículo e o controle positivo também foram preparados da mesma maneira descrita no item anterior, e a leitura das placas foi realizada em fluorímetro de microplaca.

3.8.5 Avaliação *in vitro* da fototoxicidade dos extratos pela medida da viabilidade das células expostas a radiação UV-B

A avaliação do potencial fototóxico dos extratos de *T. diversifolia* foi realizada de acordo com o procedimento preconizado pela OECD (2004), através da medida da viabilidade das células expostas a radiação UV-B pelo método de incorporação do vermelho neutro.

O ensaio de fototoxicidade celular foi realizado em microplacas de 96 poços com fundo chato, em uma concentração 4×10^4 células por poço. Após a transferência das células para as microplacas, as mesmas foram mantidas em incubadora de CO_2 , a 37°C e 5% de CO_2 (Thermo® HEPA 100), por 24 horas utilizando-se DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) para os fibroblastos L929 e queratinócitos HaCaT.

Os extratos testados foram preparados na concentração de $2,0 \text{ mg/mL}$ e estas soluções usadas para o preparo de cinco diluições diferentes para cada extrato. Os extratos foram adicionados às placas contendo as células seguindo o mesmo procedimento descrito no item 3.8.2. Após a adição dos extratos, as placas foram mantidas em estufa de CO_2 a 37°C por 24 horas, de forma que após este período, estas foram irradiadas sob radiação UV-B nas doses de $0,6 \text{ J/cm}^2$ para os fibroblastos L929 e $0,3 \text{ J/cm}^2$ para os queratinócitos HaCaT. Em cada placa foram feitos os controles irradiado e não irradiado. Após a irradiação as placas foram mantidas novamente em estufa de CO_2 e a medida da viabilidade celular foi realizada pelo método de incorporação do Vermelho Neutro.

3.8.6 Avaliação *in vitro* da eficácia fotoquimiopreventiva dos extratos pelo ensaio de geração de peróxidos lipídicos em cultura de células após a exposição à radiação UV-B

A avaliação da eficácia fotoquimiopreventiva dos extratos de *T. diversifolia* em cultura de células após exposição à radiação UV-B foi realizada através do ensaio para determinação dos níveis de peróxidos lipídicos de acordo com Morlière et al. (1991) modificado. Para a realização deste ensaio foram utilizados fibroblastos L929 e queratinócitos HaCaT.

O ensaio foi realizado em placas de 6 poços com fundo chato, em uma concentração 8×10^5 células por poço. Após a transferência das células para as placas, as mesmas foram mantidas em incubadora de CO₂ a 37°C e 5% de CO₂ (Thermo® HEPA 100), por 18 horas utilizando-se DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF). Após este período, o meio de cultura foi retirado e 1,8 mL de meio DMEM foram adicionados. Aos grupos tratados foram adicionados 200 µL de extrato na concentração de 200 µg/mL e aos dois grupos controles foram adicionados 200 µL do diluente DMSO 5% em solução salina de NaCl 0,9%. Aos poços referentes aos grupos controle não irradiado e controle irradiado, adicionou-se 2,0 mL de meio DMEM completo. As placas foram então mantidas em incubadora de CO₂ a 37°C por 24 horas.

Após o período de 24 horas na estufa na presença dos extratos, retirou-se o meio DMEM das placas e adicionou-se 2,0 mL de tampão Hanks em todos os poços de forma que as placas pudessem ser expostas à radiação UV-B, utilizando-se a dose de 7,5 J/cm² para os queratinócitos HaCaT e 30,0 J/cm² para os fibroblastos L929. Ao término da exposição à radiação UV-B, as células aderidas ao fundo dos poços foram raspadas com auxílio de um raspador de células tipo rodo, obtendo-se assim uma suspensão celular. Transferiu-se uma alíquota de 900 µL da suspensão celular de cada poço para microtubos de 2,0 mL, para realização do ensaio de determinação de peróxidos lipídicos, reservando-se 1,0 mL da suspensão para a dosagem de proteínas totais, também em microtubos de 2,0 mL, adicionando-se nesses microtubos 90 µL de solução de BHT (Hidroxitolueno butilado) 2%. Os microtubos contendo tanto a alíquota para a determinação de peróxidos lipídicos quanto para a dosagem de proteínas totais foram mantidos em congelador a - 20°C.

Para a determinação dos peróxidos lipídicos, os microtubos contendo a alíquota de 900 µL foram descongelados em estufa a 40°C e em seguida foram congelados novamente em

nitrogênio líquido, sendo novamente descongelados em estufa a 40°C. Este procedimento de congelamento e descongelamento foi repetido por duas vezes para induzir a lise celular. Após o último descongelamento, o conteúdo dos microtubos foi transferido para tubos de ensaio de vidro contendo 1,0 mL de solução de ácido tiobarbitúrico a 0,375% em HCl 0,25M contendo 15% de ácido tricloroacético (p/p) em cada, sendo que os tubos foram posteriormente aquecidos em banho-maria a 80°C por 15 minutos, seguido por resfriamento imediato em banho de gelo. O complexo MDA-ATB (malondialdeído-ácido tiobarbitúrico) formado após a etapa de aquecimento foi extraído com 2,0 mL de *n*-butanol, seguido por centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos. A fase orgânica resultante foi transferida para tubos de ensaio de vidro limpos, armazenados em gelo, e realizou-se a leitura em fluorímetro de cubeta nos comprimentos de onda de 515 nm de excitação e 550 nm de emissão.

Os microtubos contendo a alíquota de 1,0 mL da suspensão celular foram descongelados em estufa a 40°C, centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos, sendo que o sobrenadante foi transferido para placas de 96 poços para a realização da dosagem de proteínas totais pelo método espectrofotométrico de Bradford (BRADFORD, 1976).

Os resultados para o ensaio de determinação de peróxidos lipídicos em cultura de células expostas a radiação UV-B foram expressos em nM de MDA por µg de proteína.

3.9 Análise estatística dos dados obtidos pelos ensaios *in vitro*

Todos os dados obtidos nos ensaios de toxicidade celular, fotoproteção e fototoxicidade foram analisados nos softwares OriginPro® 8.6 e GraphPad Prism® versão 5.00.

Os dados obtidos para o ensaio de toxicidade celular foram submetidos à análise de regressão sigmoidal do tipo dose-resposta para obtenção dos valores de CI₅₀ (concentração do extrato capaz de reduzir a viabilidade celular em 50%), e os dados obtidos para os ensaios de atividade antioxidante por DPPH, quimiluminescência e peroxidação lipídica foram submetidos à regressão linear para a obtenção dos valores de CE₅₀. Já os dados provenientes dos ensaios de fotoproteção e fototoxicidade foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Turkey. Os valores de *p* menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

4 RESULTADOS

4.1 Amostras e Dados de Coletas

4.1.1 Cultivo e Coleta do Material

As condições de cultivo de *T. diversifolia* foram estabelecidas para as duas populações da planta nos municípios de Pires do Rio-GO e Ribeirão Preto-SP, sendo que os primeiros cinco meses de trabalho foram focados nesta etapa, a fim de se ter o material necessário para realização dos demais itens do projeto garantido até o final do período estipulado para as coletas (24 meses).

O cultivo foi realizado a partir de mudas, produzidas por estaquia, sendo que todas as estacas utilizadas para o preparo das mudas foram retiradas de duas matrizes (uma localizada no campus da USP em Ribeirão Preto-SP e outra localizada na própria fazenda em que o material é cultivado em Pires do Rio-GO), estabelecendo-se assim duas populações com 48 indivíduos para cada localidade. Os espécimes de *T. diversifolia* cultivados em Ribeirão Preto-SP e Pires do Rio-GO são apresentados, respectivamente, nas Figuras 1 e 2.

Figura 1. Área de cultivo de *T. diversifolia* no horto de plantas de medicinais da FCFRP-USP - Ribeirão Preto-SP.

Figura 2. Área de cultivo de *T. diversifolia* localizada na Faz. Santo Antônio - Pires do Rio-GO.

4.1.2 Dados Ambientais

Os dados da análise de solos para as coletas semestrais realizadas nas áreas de cultivo de *T. diversifolia* nos municípios de Pires do Rio-GO e Ribeirão Preto-SP são apresentados nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1: Níveis de macro e micronutrientes nos solos de cultivo em Pires do Rio-GO e Ribeirão Preto-SP.

Coleta	P*	K**	Ca**	Mg**	S*	B*	Cu*	Fe*	Mn*	Zn*
GO412	15,9	3,1	40,0	11,0	6,0	0,27	1,8	50,0	5,2	4,8
GO1012	12,0	2,9	32,0	11,0	6,0	0,24	1,3	23,0	4,9	2,2
GO413	13,0	1,8	34,0	7,0	5,0	0,20	1,2	22,0	1,9	0,6
GO1013	24,0	3,2	27,0	9,0	5,0	0,22	2,0	38,0	5,7	2,3
SP412	13,0	3,3	25,0	8,0	8,0	0,22	6,2	20,0	14,6	0,5
SP1012	12,0	2,8	27,0	9,0	7,0	0,24	4,1	10,0	10,7	0,4
SP413	9,0	2,5	20,0	8,0	5,0	0,23	3,8	11,0	10,0	0,3
SP1013	7,0	2,6	22,0	7,0	6,0	0,20	5,2	14,0	13,6	0,6

*P, Fe, Mn, Cu, Zn, B e S expresso em mg/dm³; **K, Ca, Mg em mmolc/dm³.

Tabela 2: Níveis dos demais indicadores de fertilidade para os solos de cultivo em Pires do Rio-GO e Ribeirão Preto-SP.

Coleta	pH	MO*	H+Al	SB**	CTC**	V%
GO412	5,8	29,0	19,0	54,0	73,0	74,0
GO1012	5,6	23,0	22,0	45,0	67,0	67,9
GO413	6,0	22,0	20,0	43,0	63,0	68,1
GO1013	5,5	25,0	21,0	39,0	60,0	64,9
SP412	5,2	30,0	31,0	36,0	67,0	54,0
SP1012	5,2	28,0	32,0	38,0	70,0	54,4
SP413	5,1	27,0	34,0	31,0	65,0	47,5
SP1013	5,3	25,0	29,0	32,0	60,0	52,6

*MO expresso em g/dm³; **SB e CTC em mmolc/dm³. Legenda: MO = Matéria orgânica; H+Al = Potencial de acidez do solo; SB = Soma de bases no solo; CTC = Capacidade de troca de cátions efetiva; V% = Porcentagem por saturação de bases no solo.

Os dados climáticos obtidos para os dois locais de coleta após o período de 24 meses de estudo são apresentados nas Figuras de 3 a 6.

Figura 3. Precipitação acumulada mensal (mm) para os municípios de Pires do Rio-GO e Ribeirão Preto-SP entre os meses de março de 2012 a fevereiro de 2014. As áreas em cinza no gráfico representam a estação chuvosa e as áreas em branco a estação seca.

Figura 4. Temperatura média mensal (°C) para os municípios de Pires do Rio-GO e Ribeirão Preto-SP entre os meses de março de 2012 a fevereiro de 2014. As áreas em cinza no gráfico representam a estação chuvosa e as áreas em branco a estação seca.

Figura 5. Umidade do ar média mensal (%) para os municípios de Pires do Rio-GO e Ribeirão Preto-SP entre os meses de março de 2012 a fevereiro de 2014. As áreas em cinza no gráfico representam a estação chuvosa e as áreas em branco a estação seca.

Figura 6. Radiação solar média mensal (kJ/m^2) para os municípios de Pires do Rio-GO e Ribeirão Preto-SP entre os meses de março de 2012 a fevereiro de 2014. As áreas em cinza no gráfico representam a estação chuvosa e as áreas em branco a estação seca.

4.2 Análise fitoquímica dos óleos essenciais e extratos

4.2.1 Análise dos óleos essenciais

A análise da composição dos óleos essenciais de *T. diversifolia* revelou um predomínio de monoterpenos (MT) em todas as amostras de óleo, principalmente hidrocarbônicos (HC), com destaque para o α -pineno (componente majoritário em quase todos os óleos essenciais analisados). A Figura 7 apresenta a proporção dos componentes encontrados nos óleos essenciais de *T. diversifolia* divididos por classe química.

Figura 7. Proporção de metabólitos secundários nos óleos essenciais de *T. diversifolia* divididos por classe. FS: Amostra de folhas de São Paulo; FG: amostra de folhas de Goiás; IS: amostra de inflorescências de São Paulo; IG: amostra de inflorescências de Goiás. MT-HC: monoterpenos hidrocarbônicos; MT-Ox: monoterpenos oxigenados; ST-HC: sesquiterpenos hidrocarbônicos; ST-Ox: sesquiterpenos oxigenados; NI: não identificado.

A Tabela 3 apresenta os três componentes majoritários para cada um dos óleos analisados e a proporção (em porcentagem) de cada um deles.

Tabela 3: Apresentação dos três componentes majoritários em cada óleo essencial de *T. diversifolia* e suas respectivas proporções (em porcentagem).

Amostra	Componentes Majoritários					
	1º	%	2º	%	3º	%
FS_Jan	α -Pineno	75,53	Limoneno	3,83	Canfeno	2,92
FG_Jan	α -Pineno	17,82	Biciclogermacreno	8,72	Cariofileno <E->	8,16
FS_Mai	β -Pineno	49,44	α -Pineno	26,20	Limoneno	3,80
FG_Mai	α -Pineno	41,92	Limoneno	8,63	Canfeno	7,55
IS_Mai	β -Pineno	37,37	α -Pineno	33,80	α -Copaeno	5,97
IG_Mai	α -Pineno	44,26	Não identificado	10,69	α -Copaeno	8,24
FS_Jun	β -Pineno	39,20	α -Pineno	27,31	Borneol	6,37
FG_Jun	α -Pineno	32,58	Cariofileno <E->	16,08	Biciclogermacreno	10,57
IS_Jun	β -Pineno	38,26	α -Pineno	36,30	α -Copaeno	4,80
IG_Jun	α -Pineno	57,18	α -Copaeno	8,33	β -Ocimeno <Z->	4,12
FS_Jul	β -Pineno	32,18	α -Pineno	31,21	Cariofileno <E->	5,15
FG_Jul	α -Pineno	35,35	Cariofileno <E->	8,15	Óxido de Cariofileno	7,55
IS_Jul	α -Pineno	33,83	β -Pineno	31,27	α -Copaeno	7,24
IG_Jul	α -Pineno	88,20	α -Copaeno	5,79	Não identificado	4,14
FS_Ago	β -Pineno	39,05	α -Pineno	36,98	Canfeno	5,51
FG_Ago	α -Pineno	53,65	Canfeno	5,71	Cariofileno <E->	5,21
FS_Dez	β -Pineno	41,64	α -Pineno	39,52	Limoneno	3,21
FG_Dez	α -Pineno	55,55	Biciclogermacreno	9,35	Cariofileno <E->	6,87
IG_Dez	α -Pineno	85,67	α -Copaeno	3,38	Limoneno	2,22

4.2.2 Substâncias isoladas do EAF

A partir da fração FAEAF foi possível obter dois flavonoides, nas sub-frações FPS2 e FPS3, e duas LST, nas sub-frações FBEAF1B-1 e FBEAF1B-2, todos já descritos para *T. diversifolia*. Os flavonoides foram isolados utilizando-se de cromatografia de exclusão por tamanho em Sephadex LH-20®, sendo que através de CCD comparativa com padrões comerciais puros foi possível identificar os flavonoides como a luteolina e hispidulina. A Figura 8 mostra a CCD comparativa para identificação dos flavonoides luteolina e hispidulina por comparação com padrões.

Figura 8. CCD comparativa para identificação dos flavonoides luteolina (nº 1 – contorno preto) e hispidulina (nº 6 – contorno vermelho) nas sub-frações FPS2 e FPS3 a partir de comparação com padrões de flavonoides. Fase móvel: AcOEt/Acetona/Diclorometano/Ác. fórmico (7:6:6:1). Revelador NP/PEG.

A partir da fração FBEAF foi possível também isolar e identificar algumas substâncias, sendo duas delas já descritas para *T. diversifolia* e uma terceira substância ainda não descrita para a espécie. As substâncias já descritas para a espécie pertencem às classes das LST e foram identificadas através de CCD comparativa e CLAE-UV-DAD por comparação com o tempo de retenção e perfil de absorção no UV das substâncias do banco de padrões do nosso laboratório (GOBBO-NETO; LOPES, 2008). A Figura 9 representa a CCD

comparativa para identificação nas sub-frações FBEAF1B-1 e FBEAF1B-2 das LST tagitinina A e tagitinina C.

Figura 9. CCD comparativa para identificação de tagitinina A (contorno preto) e tagitinina C (contorno vermelho) nas sub-frações FBEAF1B-1 e FBEAF1B-2. Fase móvel: AcOEt/Hexano (7:1). Revelador anisaldeído sulfúrico.

A terceira substância isolada a partir da fração FBEAF foi obtida da subfração FBEAF 7.25, com massa igual a 80,6 mg, sendo identificada como o ácido 4-*O*-cafeoil-2-*C*-metil-*D*-treônico (Figura 10), a qual foi descrita até o presente momento apenas para a espécie *Viguiera pazensis* Rusby (URIBURU et al., 2008). A identificação desta substância foi baseada nos espectros de RMN unidimensionais de ^1H e ^{13}C , e bidimensionais do tipo *HSQC* e *HMBC*, espectrometria de massas de alta resolução obtidos a partir da própria substância isolada assim como de um derivado obtido por reação de lactonização (desidratação) em meio ácido (OGAWA; SASHIDA, 1992; URIBURU et al., 2008) nomeado como FBEAF 7.25-lac e identificado como 3-*O*-cafeoil-2-*C*-metil-*D*-treono-1,4-lactona (Figura 11).

A massa exata obtida para a substância FBEAF 7.25 no modo de ionização positivo foi de 313,09155 $[\text{M} + \text{H}]^+$ e para o modo de ionização negativo foi de 311,07681 $[\text{M}$

– H]⁺. A fórmula molecular para a substância FBEAF 7.25 foi determinada como C₁₄H₁₆O₈, sendo que os desvios dos valores obtidos pela análise de espectrometria de massas de alta resolução em ppm, para ambos os modos de ionização, foram menores do que 5,0 ppm.

Figura 10. Estrutura química da substância FBEAF 7.25 – Ácido 4-*O*-cafeoil-2-*C*-metil-D-treônico.

A Tabela 4 apresenta os dados dos espectros de RMN ¹H e ¹³C (CD₃OD) obtidos para a substância isolada FBEAF 7.25 em comparação com os dados da literatura para o ácido 4-*O*-cafeoil-2-*C*-metil-D-treônico (URIBURU et al., 2008). Os dados espectrais de RMN ¹H e ¹³C (CD₃OD) para o derivado FBEAF 7.25-lac em comparação com os dados da literatura para a substância 3-*O*-cafeoil-2-*C*-metil-D-treono-1,4-lactona (URIBURU et al., 2008) são apresentados na Tabela 5

Figura 11. Estrutura química da substância FBEAF 7.25-lac – 3-*O*-cafeoil-2-*C*-metil-D-treono-1,4-lactona.

Tabela 4: Dados do espectro de RMN ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) para a substância FBEAF 7.25, identificada como ácido 4-*O*-cafeoil-2-*C*-metil-*D*-treônico (δ em ppm, J em Hz).

FBEAF 7.25		Referência	
^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
1,43 (3H, s; CH_3 -5')	22,8 (C-5')	1,43 (3H, s)	23,1
4,05 (1H, dd, $J = 7,9$ e $3,2$; H-3')	74,9 (C-3')	4,0 (1H, m)	75,1
4,20 (1H, dd, $J = 11,5$ e $7,9$; H-4'b)	65,9 (C-4')	4,20 (1H, dd, $J = 11,0$ e $1,5$)	66,2
4,46 (1H, dd, $J = 11,5$ e $3,2$; H-4'a)	-	4,45 (1H, dd, $J = 11,0$ e $7,5$)	-
6,29 (1H, d, $J = 15,9$; H-8)	115,0 (C-8)	6,30 (1H, d, $J = 15,9$)	114,9
6,78 (1H, d, $J = 8,2$; H-5)	116,5 (C-5)	6,78 (1H, d, $J = 8,1$)	116,3
6,96 (1H, dd, $J = 8,2$ e $2,0$; H-6)	122,9 (C-6)	6,95 (1H, dd, $J = 8,1$ e $1,9$)	122,7
7,05 (1H, d, $J = 2,0$; H-2)	115,2 (C-2)	7,04 (1H, d, $J = 1,9$)	115,2
7,59 (1H, d, $J = 15,9$)	146,9 (C-7)	7,60 (1H, d, $J = 15,9$)	146,8
-	127,8 (C-1)	-	127,6
-	146,8 (C-3)	-	146,6
-	149,6 (C-4)	-	149,5
-	169,3 (C-9)	-	169,2
-	178,1 (C-1')	-	179,2
-	77,3 (C-2')	-	76,9

Tabela 5: Dados do espectro de RMN ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) para a substância FBEAF 7.25-lac, identificada como ácido 3-*O*-cafeoil-2-*C*-metil-*D*-treono-1,4-lactona (δ em ppm, J em Hz).

FBEAF 7.25-lac		Referência	
^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
1,42 (3H, s; CH_3 -5')	18,2 (C-5')	1,42 (3H, s)	18,1
5,30 (1H, dd, $J = 5,0$ e $3,1$; H-3')	77,3 (C-3')	5,30 (1H, dd, $J = 5,0$ e $3,2$)	77,1
4,20 (1H, dd, $J = 10,3$ e $3,1$; H-4'b)	71,1 (C-4')	4,19 (1H, dd, $J = 10,2$ e $3,2$)	71,0
4,69 (1H, dd, $J = 10,3$ e $5,0$; H-4'a)	-	4,69 (1H, dd, $J = 10,2$ e $5,0$)	-
6,31 (1H, d, $J = 15,9$; H-8)	113,8 (C-8)	6,30 (1H, d, $J = 15,9$)	113,6
6,78 (1H, d, $J = 8,2$; H-5)	116,5 (C-5)	6,78 (1H, d, $J = 8,2$)	116,4
6,98 (1H, dd, $J = 8,2$ e $2,1$; H-6)	123,3 (C-6)	6,97 (1H, dd, $J = 8,2$ e $1,8$)	123,2
7,06 (1H, d, $J = 2,1$; H-2)	115,3 (C-2)	7,06 (1H, d, $J = 1,8$)	115,3
7,61 (1H, d, $J = 15,9$)	148,4 (C-7)	7,60 (1H, d, $J = 15,9$)	148,2
-	127,4 (C-1)	-	127,4
-	146,9 (C-3)	-	146,9
-	150,0 (C-4)	-	150,0
-	167,8 (C-9)	-	167,7
-	178,3 (C-1')	-	178,2
-	74,7 (C-2')	-	74,7

4.2.3 Substâncias isoladas do EAI

A partir da fração FAEAI do EAI de *T. diversifolia* obteve-se após os processos cromatográficos empregados, oito substâncias isoladas, oriundas das sub-frações FAEAI 4 e FAEAI 5.

Da subfração FAEAI 4 isolou-se as substâncias FAEAI 4.5 (21,0 mg), FAEAI 4.6 (8,3 mg) e FAEAI 4.9 (13,9 mg), e da subfração FAEAI 5 isolou-se as substâncias FAEAI 5.5 (6,0 mg), FAEAI 5.6 (92,0 mg) e FAEAI 5.8 (8,6 mg). A pureza das substâncias isoladas (calculada pelo perfil cromatográfico obtido em comprimento de onda de máxima absorção para cada composto) é apresentada na Tabela 6.

Tabela 6: Pureza percentual das substâncias isoladas da fração FAEAI do EAI de *T. diversifolia*, obtidos em CLAE-UV-DAD.

Substância isolada	Pureza (%)	$\lambda_{\text{máx}}$
FAEAI 4.5	95,24	295
FAEAI 4.6	76,36	325
FAEAI 4.9	79,84	325
FAEAI 5.5	88,83	325
FAEAI 5.6	74,35	325
FAEAI 5.8	74,97	325

Os dados de RMN ^1H , *HSQC* e *HMBC*, e de espectrometria de massas de alta resolução, após comparação com dados da literatura, permitiram realizar a identificação das seguintes substâncias isoladas: FAEAI 4.5 (identificada como ácido protocatecuico – Figura 12), FAEAI 4.6 (identificado como ácido 5-*O*-cafeoilquínico – Figura 13), FAEAI 4.9 (ácido cafeico – Figura 14), FAEAI 5.5 (ácido 4,5-*O*-dicafeoilquínico – Figura 15), FAEAI 5.6 (ácido 3,5-*O*-dicafeoilquínico – Figura 16) e FAEAI 5.8 (ácido 3,4-*O*-dicafeoilquínico – Figura 17). As substâncias FAEAI 5.5 e FAEAI 5.8, identificadas como ácido 4,5-*O*-dicafeoilquínico e ácido 3,4-*O*-dicafeoilquínico, respectivamente, foram isoladas pela primeira vez na espécie *T. diversifolia*.

A massa exata obtida para a substância FAEAI 4.5 no modo de ionização positivo foi de 155,03384 $[\text{M} + \text{H}]^+$ e para o modo de ionização negativo foi de 153,01932 $[\text{M} - \text{H}]^-$. A fórmula molecular para a substância FAEAI 4.5 foi determinada como $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_4$, sendo que os desvios dos valores obtidos pela análise de espectrometria de massas de alta resolução em ppm, para ambos os modos de ionização, foram menores do que 5,0 ppm.

Figura 12. Estrutura química da substância FAEAI 4.5 – Ácido protocatecuico.

Os dados de RMN ^1H e ^{13}C (CD_3OD) obtidos para a substância FAEAI 4.5 em comparação com a literatura (GUTZEIT et al., 2006) para o ácido protocatecuico são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7: Dados do espectro de RMN ^1H (400 MHz) e ^{13}C (*HSQC* e *HMBC*) para a substância FAEAI 4.5, identificada como ácido protocatecuico (δ em ppm, J em Hz).

FAEAI 4.5		Referência	
^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
6,79 (1H, d, $J = 8,0$; H-5)	115,5 (C-5)	6,78 (1H, d, $J = 8,0$)	115,75
7,43 (1H, d, $J = 1,3$; H-2)	117,5 (C-2)	7,44 (1H, d, $J = 1,5$)	117,78
-	122,8 (C-1)	-	123,72
7,41 (1H, m; H-6)	123,6 (C-6)	7,41 (1H, dd, $J = 8,0$ e $1,5$)	123,84
-	145,8 (C-3)	-	146,0
-	151,3 (C-4)	-	151,34
-	170,0 (C-7)	-	170,59

A massa exata obtida para a substância FAEAI 4.6 no modo de ionização positivo foi de 355,10217 $[\text{M} + \text{H}]^+$ e para o modo de ionização negativo foi de 353,08728 $[\text{M} - \text{H}]^-$. A fórmula molecular para a substância FAEAI 4.6 foi determinada como $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$, sendo que os desvios dos valores obtidos pela análise de espectrometria de massas de alta resolução em ppm, para ambos os modos de ionização, foram menores do que 5,0 ppm.

A Tabela 8 apresenta os dados dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos para a substância isolada FAEAI 4.6 em comparação com os dados da literatura para o ácido 5-*O*-cafeoilquínico (LIN; KUO; CHOU, 1999; PAULI; POETSCH; NAHRSTEDT, 1998).

Figura 13. Estrutura química da substância FAEAI 4.6 – Ácido 5-*O*-cafeoilquínico.

Tabela 8: Dados do espectro de RMN ^1H (400 MHz) e ^{13}C (*HSQC* e *HMBC*) para a substância FAEAI 4.6, identificada como ácido 5-*O*-cafeoilquínico (δ em ppm, J em Hz).

FAEAI 4.6		Referência	
^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
2,04 (1H, m; H-2 _{eq})	38,2 (C-2)	2,047 (1H, ddd, $J = 14,2$, 5,1 e 2,3)	38,55
2,09 (1H, m; H-6 _{ax})	38,6 (C-6)	2,063 (1H, dd, $J = 13,3$ e 9,7)	39,92
2,18 (1H, m; H-2 _{ax})	-	2,166 (1H, dd, $J = 14,2$ e 3,3)	-
2,24 (1H, m; H-6 _{eq})	-	2,232 (1H, ddd, $J = 13,3$, 4,5 e 2,3)	-
3,73 (1H, dd, $J = 8,3$ e 3,3; H-4)	73,0 (C-4)	3,721 (1H, dd, $J = 8,6$ e 3,2)	74,29
4,17 (1H, m; H-3)	71,4 (C-3)	4,165 (1H, dt, $J = 5,1$, 3,3 e 3,2)	72,31
5,33 (1H, ddd, $J = 9,6$, 8,8 e 4,5; H-5)	73,7 (C-5)	5,336 (1H, ddd, $J = 9,7$, 8,6 e 4,5)	72,4
6,27 (1H, d, $J = 15,9$; H-8')	115,4 (C-8')	6,251 (1H, d, $J = 15,9$)	115,38
6,78 (1H, d, $J = 8,2$; H-5')	116,3 (C-5')	6,772 (1H, d, $J = 8,2$)	116,82
6,96 (1H, dd, $J = 8,2$ e 2,1; H-6')	122,8 (C-6')	6,938 (1H, dd, $J = 8,2$ e 2,1)	123,33
7,05 (1H, d, $J = 2,1$; H-2')	115,1 (C-2')	7,04 (1H, d, $J = 2,1$)	115,56
7,56 (1H, d, $J = 15,9$; H-7')	146,9 (C-7')	7,55 (1H, d, $J = 15,9$)	147,01
-	76,2 (C-1)	-	77,74
-	146,8 (C-3')	-	145,84
-	149,6 (C-4')	-	148,64
-	168,8 (C-9')	-	169,72
-	127,8 (C-1')	-	127,78

A massa exata obtida para a substância FAEAI 4.9 no modo de ionização positivo foi de 181,04971 $[M + H]^+$ e para o modo de ionização negativo foi de 179,03410 $[M - H]^-$. A fórmula molecular para a substância FAEAI 4.6 foi determinada como $C_9H_8O_4$, sendo que os desvios dos valores obtidos pela análise de espectrometria de massas de alta resolução em ppm, para ambos os modos de ionização, foram menores do que 5,0 ppm.

Figura 14. Estrutura química da substância FAEAI 4.9 – Ácido cafeico.

Os dados de RMN 1H e ^{13}C (CD_3OD) obtidos para a substância FAEAI 4.9 em comparação com a literatura (TENG et al., 2005) para o ácido cafeico são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9: Dados do espectro de RMN 1H (400 MHz) e ^{13}C (*HSQC* e *HMBC*) para a substância FAEAI 4.9, identificada como ácido cafeico (δ em ppm, J em Hz).

FAEAI 4.9		Referência	
1H	^{13}C	1H	^{13}C
6,22 (1H, d, $J = 16,0$; H-8)	115,0 (C-8)	6,22 (1H, d, $J = 16,4$)	115,09
6,78 (1H, d, $J = 8,2$; H-5)	116,2 (C-5)	6,77 (1H, d, $J = 8,1$)	116,40
6,94 (1H, dd, $J = 8,2$ e $1,8$; H-6)	122,6 (C-6)	6,92 (1H, dd, $J = 8,1$ e $1,5$)	122,80
7,04 (1H, d, $J = 1,8$; H-2)	115,3 (C-2)	7,03 (1H, d, $J = 1,5$)	115,82
7,53 (1H, d, $J = 16,0$; H-7)	146,7 (C-7)	7,52 (1H, d, $J = 16,4$)	147,84
-	127,4 (C-1)	-	127,84
-	148,0 (C-3)	-	146,71
-	149,1 (C-4)	-	149,33
-	170,8 (C-9)	-	171,41

A massa exata obtida para a substância FAEAI 5.5 no modo de ionização positivo foi de 517,13411 $[M + H]^+$ e para o modo de ionização negativo foi de 515,11915 $[M - H]^-$. A fórmula molecular para a substância FAEAI 5.5 foi determinada como $C_{25}H_{24}O_{12}$, sendo que os desvios dos valores obtidos pela análise de espectrometria de massas de alta resolução em ppm, para ambos os modos de ionização, foram menores do que 5,0 ppm.

Os dados de RMN ^1H e ^{13}C (CD_3OD) obtidos para a substância FAEAI 5.5 em comparação com a literatura (PAULI; POETSCH; NAHRSTEDT, 1998; SHI et al., 2007) para o ácido 4,5-*O*-dicafeoilquínico são apresentados na Tabela 10.

Figura 15. Estrutura química da substância FAEAI 5.5 – Ácido 4,5-*O*-dicafeoilquínico.

Tabela 10: Dados do espectro de RMN ^1H (400 MHz) e ^{13}C (*HSQC* e *HMBC*) para a substância FAEAI 5.5, identificada como ácido 4,5-*O*-dicafeoilquínico (δ em ppm, *J* em Hz).

FAEAI 5.5		Referência	
^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
2,09 (1H, m; H-2 _{eq})	36,8 (C-2)	2,10 (1H, ddd, <i>J</i> = 14,2, 5,1 e 2,0)	38,5
2,22 (2H, m; H-6 _{ax} e 6 _{eq})	41,5 (C-6)	2,214 (dd, <i>J</i> = 13,3 e 9,6; H-6 _{ax}); 2,272 (ddd, <i>J</i> = 13,3, 4,8 e 2,0; H-6 _{eq})	39,8
2,35 (1H, dd, <i>J</i> = 14,3 e 3,3 H-2 _{ax})	-	2,287 (1H, dd, <i>J</i> = 14,2 e 3,3)	-
4,36 (1H, m; H-3)	65,6 (C-3)	4,359 (1H, dt, <i>J</i> = 5,1, 3,3 e 3,1)	69,8
5,01 (1H, dd, <i>J</i> = 8,8 e 3,4; H-4)	76,1 (C-4)	5,103 (1H, dd, <i>J</i> = 9,1 e 3,1)	76,1
5,64 (1H, m; H-5)	69,8 (C-5)	5,62 (1H, ddd, <i>J</i> = 9,6, 9,1 e 4,8)	69,2
6,26 (1H, d, <i>J</i> = 15,9; H-8'')	114,7 (C-8'')	6,179 (1H, d, <i>J</i> = 15,9)	114,7
6,28 (1H, d, <i>J</i> = 15,9; H-8')	114,9 (C-8')	6,271 (1H, d, <i>J</i> = 15,9)	114,7
6,73 (1H, d, <i>J</i> = 8,2; H-5'')	116,2 (C-5', 5'')	6,726 (1H, d, <i>J</i> = 8,3)	116,4

6,77 (1H, d, $J = 8,2$; H-5')	-	6,74 (1H, d, $J = 8,3$)	116,4
6,88 (1H, dd, $J = 8,2$ e $2,1$; H-6'')	122,9 (C-6')	6,89 (1H, dd, $J = 8,3$ e $2,1$)	123,2
6,92 (1H, dd, $J = 8,2$ e $2,1$; H-6')	122,7 (C-6'')	6,913 (1H, dd, $J = 8,3$ e $2,1$)	123,2
7,02 (1H, d, $J = 2,1$; H-2'')	114,9 (C-2', 2'')	6,993 (1H, d, $J = 2,1$)	115,1
7,04 (1H, d, $J = 2,1$; H-2')	-	7,013 (1H, d, $J = 2,1$)	115,2
7,55 (1H, d, $J = 15,9$; H7'')	147,1 (C-7', 7'')	7,507 (1H, d, $J = 15,9$)	147,5
7,57 (1H, d, $J = 15,9$; H-7')	-	7,587 (1H, d, $J = 15,9$)	147,7
-	76,7 (C-1)	-	76,2
-	127,5 (C-1', 1'')	-	127,6
-	146,5 (C-3', 3'')	-	146,7
-	149,4 (C-4', 4'')	-	149,6
-	168,3 (C-9')	-	168,3
-	168,5 (C-9'')	-	168,6
-	176,5 (C-7)	-	176,8

A massa exata obtida para a substância FAEAI 5.6 no modo de ionização positivo foi de 517,13383 $[M + H]^+$ e para o modo de ionização negativo foi de 515,11909 $[M - H]^-$. A fórmula molecular para a substância FAEAI 5.6 foi determinada como $C_{25}H_{24}O_{12}$, sendo que os desvios dos valores obtidos pela análise de espectrometria de massas de alta resolução em ppm, para ambos os modos de ionização, foram menores do que 5,0 ppm.

Os dados de RMN 1H e ^{13}C (CD_3OD) obtidos para a substância FAEAI 5.5 em comparação com a literatura (PAULI; POETSCH; NAHRSTEDT, 1998; SHI et al., 2007) para o ácido 3,5-*O*-dicafeoilquínico são apresentados na Tabela 11.

A massa exata obtida para a substância FAEAI 5.8 no modo de ionização positivo foi de 517,13387 $[M + H]^+$ e para o modo de ionização negativo foi de 515,11870 $[M - H]^-$. A fórmula molecular para a substância FAEAI 5.8 foi determinada como $C_{25}H_{24}O_{12}$, sendo que os desvios dos valores obtidos pela análise de espectrometria de massas de alta resolução em ppm, para ambos os modos de ionização, foram menores do que 5,0 ppm.

Os dados de RMN 1H e ^{13}C (CD_3OD) obtidos para a substância FAEAI 5.8 em comparação com a literatura (KIM et al., 2011; SATAKE et al., 2007) para o ácido 3,4-*O*-dicafeoilquínico são apresentados na Tabela 12.

Os espectros de RMN 1H para as substâncias FBEAF 7.25, FBEAF 7.25-lac, FAEAI 4.5, FAEAI 4.6, FAEAI 4.9, FAEAI 5.5, FAEAI 5.6 e FAEAI 5.8, respectivamente, são apresentados nos APÊNDICES de A até H. Os espectros de RMN bidimensionais do tipo *HSQC* para as substâncias FBEAF 7.25, FBEAF 7.25-lac, FAEAI 4.5, FAEAI 4.6, FAEAI 4.9, FAEAI 5.5, FAEAI 5.6 e FAEAI 5.8, respectivamente, são apresentados nos APÊNDICES de I até P. Os espectros de RMN bidimensionais do tipo *HMBC* para as

substâncias FBEAF 7.25, FBEAF 7.25-lac, FAEAI 4.5, FAEAI 4.6, FAEAI 4.9, FAEAI 5.5, FAEAI 5.6 e FAEAI 5.8, respectivamente, são apresentados nos APÊNDICES de Q até Z.

Figura 16. Estrutura química da substância FAEAI 5.6 – Ácido 3,5-O-dicafeoilquínico.

Tabela 11: Dados do espectro de RMN ^1H (400 MHz) e ^{13}C (*HSQC* e *HMBC*) para a substância FAEAI 5.6, identificada como ácido 3,5-O-dicafeoilquínico (δ em ppm, J em Hz).

FAEAI 5.6		Referência	
^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
2,17 (1H, dd, $J = 14,0$ e $7,0$; H-2 _{eq})	35,8 (C-2)	2,156 (1H, ddd, $J = 13,8$, $7,0$ e $1,5$)	37,8
2,23 (2H, m, H-6 _{ax} e H-6 _{eq})	37,3 (C-6)	2,197 (1H, dd $J = 14,0$ e $7,5$; H-6 _{ax}); 2,237 (1H, ddd, $J = 14,0$, $4,2$ e $1,5$; H-6 _{eq})	36,1
2,32 (1H, dd, $J = 14,0$ e $4,0$; H-2 _{ax})	-	2,311 (1H, dd, $J = 13,8$ e $4,0$)	-
3,98 (1H, dd, $J = 7,5$ e $3,3$; H-4)	70,4 (C-4)	3,963 (1H, dd, $J = 7,5$ e $3,3$)	70,7
5,38 (1H, m; H-5)	71,8 (C-5)	5,378 (1H, ddd, $J = 7,5$, $7,5$ e $4,2$)	72,6
5,43 (1H, dt, $J = 6,9$, $3,6$ e $1,5$; H-3)	72,3 (C-3)	5,421 (1H, dt, $J = 7,0$, $4,0$ e $1,5$)	72,1

3,6; H-3)		3,3)	
6,29 (1H, d, $J = 15,9$; H-8'')	114,9 (C-8'')	6,255 (1H, d, $J = 15,9$)	115,1
6,37 (1H, d, $J = 15,9$; H-8')	115,3 (C-8')	6,338 (1H, d, $J = 15,9$)	115,6
6,80 (1H, d, $J = 8,2$; H-5'')	116,2 (C-5', 5'')	6,774 (1H, d, $J = 8,2$)	116,5
6,81 (1H, d, $J = 8,2$; H-5')	-	6,776 (1H, d, $J = 8,2$)	116,5
6,97 (1H, dd, $J = 8,2$ e $2,1$; H-6'')	122,8 (C-6', 6'')	6,956 (1H, dd, $J = 8,2$ e $2,1$)	123,0
6,98 (1H, dd, $J = 8,2$ e $2,1$; H-6')	-	6,966 (1H, dd, $J = 8,2$ e $2,1$)	123,1
7,09 (1H, d, $J = 2,1$; H-2'')	115,0 (C-2', 2'')	7,054 (1H, d, $J = 2,1$)	115,1
7,095 (1H, d, $J = 2,1$; H-2')	-	7,059 (1H, d, $J = 2,1$)	115,2
7,58 (1H, d, $J = 15,9$; H-7'')	146,9 (C-7'')	7,568 (1H, d, $J = 15,9$)	147
7,62 (1H, d, $J = 15,9$; H-7')	146,8 (C-7')	7,61 (1H, d, $J = 15,9$)	146,8
-	74,6 (C-1)	-	74,9
-	127,5 (C-1')	-	127,8
-	127,7 (C-1'')	-	127,9
-	146,6 (C-3', 3'')	-	146,8
-	149,2 (C-4')	-	149,5
-	149,4 (C-4'')	-	149,6
-	168,3 (C-9')	-	168,3
-	168,5 (C-9'')	-	168,9
-	177,0 (C-7)	-	177,8

Figura 17. Estrutura química da substância FAEAI 5.8 – Ácido 3,4-O-dicafeoilquínico.

Tabela 12: Dados do espectro de RMN ^1H (400 MHz) e ^{13}C (HSQC e HMBC) para a substância FAEAI 5.8, identificada como ácido 3,4-*O*-dicafeoilquínico (δ em ppm, J em Hz).

FAEAI 5.8		Referência	
^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
2,10 (1H, dd, $J = 14,5$ e $5,3$; H-2 _{eq})	38,2	2,11 (1H, ddd, $J = 14,4$, $5,2$ e $1,6$)	38,42
2,24 (2H, m; H-6 _{eq} e H-6 _{ax})	39,2	2,23 (1H, dd, $J = 13,2$ e $9,6$; H-6 _{ax}); 2,29 (1H, ddd, $J = 13,2$, $5,1$ e $1,6$; H-6 _{eq})	39,52
2,30 (1H, dd, $J = 14,5$ e $3,2$; H-2 _{ax})	-	2,30 (1H, dd, $J = 14,4$ e $3,1$)	-
4,37 (1H, dt, $J = 5,3$ e $3,2$; H-5)	69,2 (C-5)	4,37 (1H, dt, $J = 5,2$ e $3,1$)	69,37
5,12 (1H, dd, $J = 9,0$ e $3,1$; H-4)	75,6 (C-4)	5,12 (1H, dd, $J = 9,0$ e $3,1$)	75,76
5,62 (1H, dd, $J = 9,0$ e $5,1$; H-3)	68,8 (C-3)	5,63 (1H, ddd, $J = 9,6$, $9,0$ e $5,1$)	68,99
6,19 (1H, d, $J = 15,9$; H-8'')	114,6 (C-8', 8'')	6,19 (1H, d, $J = 15,5$)	114,72
6,28 (1H, d, $J = 15,9$; H-8')	-	6,29 (1H, d, $J = 15,8$)	114,77
6,74 (1H, d, $J = 8,0$; H-5'')	116,3 (C-5', 5'')	6,75 (1H, d, $J = 8,0$)	116,49
6,75 (1H, d, $J = 8,0$; H-5')	-	6,76 (1H, d, $J = 8,0$)	116,49
6,90 (1H, dd, $J = 8,0$ e $2,0$; H-6'')	122,9 (C-6', 6'')	6,91 (1H, dd, $J = 8,0$ e $2,0$)	123,18
6,92 (1H, dd, $J = 2,0$ e $8,0$; H-6')	-	6,92 (1H, dd, $J = 8,5$ e $2,0$)	123,23
7,01 (1H, d, $J = 2,0$; H-2'')	115,0 (C-2', 2'')	7,01 (1H, d, $J = 2,0$)	115,19
7,02 (1H, d, $J = 2,0$; H-2')	-	7,02 (1H, d, $J = 2,0$)	115,21
7,52 (1H, d, $J = 15,9$; H-7'')	147,3 (C-7'')	7,52 (1H, d, $J = 15,5$)	147,57
7,60 (1H, d, $J = 15,9$; H-7')	147,6 (C-7')	7,60 (1H, d, $J = 15,8$)	147,7
-	75,5 (C-1)	-	76,07
-	127,5 (C-1', 1'')	-	127,7
-	146,6 (C-3', 3'')	-	146,7
-	149,5 (C-4', 4'')	-	149,65 (C-4'); 149,67 (C-4'')
-	168,0 (C-9')	-	168,23
-	168,5 (C-9'')	-	168,56
-	176,8 (C-7)	-	176,8

4.3 Análise da variação sazonal dos metabólitos secundários e influência ambiental

4.3.1 Análise dos extratos de *T. diversifolia* por UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS e RMN ^1H e *J*-resolved

Após a análise dos 170 extratos de *T. diversifolia* por UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS e o processamento dos dados obtidos pelos softwares MSConvert e MZmine 2.10, foi possível

observar a presença de 1277 picos para os extratos analisados no modo de ionização positivo e 1084 picos no modo de ionização negativo. Os dados obtidos foram separados de acordo com o modo de ionização e parte da planta (folhas, caules, raízes e inflorescências), e posteriormente os dados obtidos no modo de ionização negativo foram utilizados na etapa de concatenação dos dados.

Ao fim da análise dos extratos de *T. diversifolia* por RMN (^1H e *J-resolved*) e o processamento dos dados obtidos pelo software MestreNova versão 8, foi possível obter as matrizes de dados com os valores de deslocamento químico para os componentes de todos os extratos. Os dados obtidos pela análise de RMN do tipo *J-resolved* foram combinados pelo método de concatenação com os dados de UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS obtidos no modo de ionização negativo. Os dados concatenados foram utilizados para realização das análises de HCA, PCA e OPLS-DA.

Os dados de UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS obtidos no modo de ionização positivo demonstraram a ocorrência de extensa fragmentação de substâncias na fonte de ionização para as condições utilizadas no método, de forma que os dados obtidos no modo de ionização negativo foram considerados mais adequados para a realização das análises quimiométricas. Já os dados de RMN ^1H obtidos pelo método de pré-saturação apresentaram um grande número de sinais sobrepostos na faixa compreendida entre 3 e 4 ppm, devido, principalmente, aos desdobramentos dos sinais nesta faixa de deslocamento químico resultante do efeito de acoplamento de *spins*, de forma que os dados obtidos por RMN do tipo *J-resolved*, não apresentaram tal problema, visto que técnica permite a separação dos valores de deslocamento químico e de acoplamento em eixos diferentes, e em razão deste fato, os dados de *J-resolved* foram considerados mais adequados para a realização das análises quimiométricas.

O dendrograma obtido após a análise de HCA e o *score plot* obtido pela análise por PCA, para os dados dos extratos das folhas de *T. diversifolia* estão representados nas Figuras 18 e 19.

A Figura 20 apresenta a comparação do *loading plots* obtidos pela análise de PCA dos dados concatenados e utilizando apenas os dados de RMN do tipo *J-resolved*, para os extratos das folhas, e a relação com as principais classes de metabólitos utilizados como discriminantes e também com os fatores ambientais analisados.

Figura 18. Dendrograma da análise de HCA para os dados concatenados obtidas a partir dos extratos de folhas de *T. diversifolia* com a proposta de agrupamento. Proposta de grupos: GF1 (verde), GF2 (azul), GF3 (amarelo), GF4 (roxo), *Outlier* (vermelho). Legenda: FS = Folhas coletadas no estado de São Paulo; FG = Folhas coletadas no estado de Goiás; Primeiro número = mês (1 para janeiro até 12 para dezembro); Segundo número = ano (12 para 2012 até 14 de 2014).

Figura 19. Score plot da análise por PCA para os dados concatenados obtidos a partir dos extratos de folhas de *T. diversifolia* com a proposta de agrupamento. Proposta de grupos: GF1 (verde), GF2 (azul), GF3 (amarelo), GF4 (roxo), *Outlier* (vermelho). Legenda: FS = Folhas coletadas no estado de São Paulo; FG = Folhas coletadas no estado de Goiás; Primeiro número = mês (1 para janeiro até 12 para dezembro); Segundo número = ano (12 para 2012 até 14 de 2014); Umi = Umidade; Ppt = Precipitação; Temp = Temperatura.

Figura 20. Loading plots da análise por PCA para os dados concatenados (A) e de *J-resolved* (B) obtidos a partir dos extratos de folhas de *T. diversifolia* e a relação com os fatores ambientais e classes discriminantes de metabolitos. Legenda: Ppt = Precipitação; Umi = Umidade; Temp = Temperatura.

O *score plot* obtido pela análise por OPLS-DA realizada com os dados concatenados dos extratos das folhas de *T. diversifolia* é apresentado na Figura 21.

Figura 21. *Score plot* da análise por OPLS-DA para os dados concatenados obtidos a partir dos extratos de folhas de *T. diversifolia* com a proposta de agrupamento. Legenda: GF = Grupo para os extratos de folhas.

Os resultados obtidos para os extratos de caules de *T. diversifolia*, obtidos pela análise dos dados concatenados por HCA é representado no dendrograma da Figura 22.

Figura 22. Dendrograma da análise de HCA para os dados concatenados obtidos a partir dos extratos de caules de *T. diversifolia* com a proposta de agrupamento. Proposta de grupos: GC1 (verde), GC2 (azul), GC3 (amarelo), GC4 (roxo), *Outlier* (vermelho). Legenda: CS = Caules coletados no estado de São Paulo; CG = Caules coletados no estado de Goiás; Primeiro número = mês (1 para janeiro até 12 para dezembro); Segundo número = ano (12 para 2012 até 14 de 2014).

As Figuras 23 e 24 representam o *score plot* e os *loading plots*, respectivamente, obtidos pela análise por PCA dos dados concatenados dos extratos de caules.

Figura 23. Score plot da análise por PCA para os dados concatenados obtidos a partir dos extratos de caules de *T. diversifolia* com a proposta de agrupamento. Proposta de grupos: GC1 (verde), GC2 (azul), GC3 (amarelo), GC4 (roxo), *Outlier* (vermelho). Legenda: CS = Caules coletados no estado de São Paulo; CG = Caules coletados no estado de Goiás; Primeiro número = mês (1 para janeiro até 12 para dezembro); Segundo número = ano (12 para 2012 até 14 de 2014); Umi = Umidade; Ppt = Precipitação; Temp = Temperatura; Rad = Radiação solar.

Figura 24. Loading plots da análise por PCA para os dados concatenados (A) e de *J*-resolved (B) obtidos a partir dos extratos de caules de *T. diversifolia* e a relação com os fatores ambientais e classes discriminantes de metabolitos. Legenda: Ppt = Precipitação; Umi = Umidade; Temp = Temperatura, Rad = Radiação solar.

O *score plot* obtido pela análise por OPLS-DA realizada com os dados concatenados dos extratos dos caules é apresentado na Figura 25.

Figura 25. *Score plot* da análise por OPLS-DA para os dados concatenados obtidos a partir dos extratos dos caules de *T. diversifolia* com a proposta de agrupamento. Legenda: GC = Grupo para os extratos de caules.

Os resultados obtidos pela análise de HCA realizada com os dados concatenados dos extratos de raízes de *T. diversifolia* são representados no dendrograma da Figura 26.

Figura 26. Dendrograma da análise de HCA para os dados concatenados obtidos a partir dos extratos de raízes de *T. diversifolia* com a proposta de agrupamento. Proposta de grupos: GR1 (verde), GR2 (azul), GR3 (amarelo). Legenda: RS = Raízes coletadas no estado de São Paulo; RG = Raízes coletadas no estado de Goiás; Primeiro número = mês (1 para janeiro até 12 para dezembro); Segundo número = ano (12 para 2012 até 14 de 2014).

Através da análise por PCA realizada com os dados concatenados dos extratos das raízes obteve-se o *score plot* e os *loading plots* representados nas Figuras 27 e 28.

Figura 27. Score plot da análise por PCA para os dados concatenados obtidos a partir dos extratos de raízes de *T. diversifolia* com a proposta de agrupamento. Proposta de grupos: GR1 (verde), GR2 (azul), GR3 (amarelo). Legenda: RS = Raízes coletadas do estado de São Paulo; RG = Raízes coletadas no estado de Goiás; Primeiro número = mês (1 para janeiro até 12 para dezembro); Segundo número = ano (12 para 2012 até 14 de 2014); P = Fósforo; K = Potássio; Ca = Cálcio; Mg = Magnésio.

Figura 28. *Loading plots* da análise por PCA para os dados concatenados (A) e de *J-resolved* (B) obtidos a partir dos extratos de raízes de *T. diversifolia* e a relação com os fatores ambientais e classes discriminantes de metabolitos. Legenda: P = Fósforo; K = Potássio; Ca = Cálcio; Mg = Magnésio.

O *score plot* obtido pela análise por OPLS-DA realizada com os dados concatenados dos extratos das raízes é apresentado na Figura 29.

Figura 29. *Score plot* da análise por OPLS-DA para os dados concatenados obtidos a partir dos extratos de raízes de *T. diversifolia* com a proposta de agrupamento. Legenda: GR = Grupo para os extratos de raízes.

O dendrograma obtido pela análise de HCA realizada com os dados concatenados dos extratos das inflorescências de *T. diversifolia* é apresentado na Figura 30.

Figura 30. Dendrograma da análise de HCA para os dados concatenados obtidos a partir dos extratos de inflorescências de *T. diversifolia* com a proposta de agrupamento. Proposta de grupos: GI1 (verde), GI2 (azul), *Outlier* (vermelho). Legenda: IS = Inflorescências coletadas no estado de São Paulo; IG = Inflorescências coletadas no estado de Goiás; Primeiro número = mês (1 para janeiro até 12 para dezembro); Segundo número = ano (12 para 2012 até 14 de 2014).

Através da análise por PCA realizada com os dados concatenados dos extratos das inflorescências obteve-se o *score plot* e os *loading plots* representados nas Figuras 31 e 32.

Figura 31. *Score plot* da análise por PCA para os dados concatenados obtidos a partir dos extratos de inflorescências de *T. diversifolia* com a proposta de agrupamento. Proposta de grupos: G1 (verde), G2 (azul), *Outlier* (vermelho). Legenda: IS = Inflorescências coletadas do estado de São Paulo; IG = Inflorescências coletadas no estado de Goiás; Primeiro número = mês (1 para janeiro até 12 para dezembro); Segundo número = ano (12 para 2012 até 14 de 2014); Ca = Cálcio; Cu = Cobre; Temp = Temperatura; Rad = Radiação solar.

O *score plot* obtido pela análise por OPLS-DA realizada com os dados concatenados dos extratos das inflorescências é apresentado na Figura 33.

Figura 33. Score plot da análise por OPLS-DA para os dados concatenados obtidos a partir dos extratos de inflorescências de *T. diversifolia* com a proposta de agrupamento. Legenda: GI = Grupo para os extratos de inflorescências.

4.3.2 Análise da variação dos óleos essenciais por CG-EM

Os dados do estudo de variação dos óleos essenciais de *T. diversifolia* (dados químicos obtidos dos óleos essenciais por CG-EM e dados ambientais climáticos e de solo) foram submetidos a análises por HCA, PCA e OPLS-DA, sendo os resultados das respectivas análises apresentados nas Figuras 34 a 37. Para os OE, a análise de PCA foi capaz de explicar com duas componentes principais até 85,7% da variância para o conjunto de variáveis químico-orgânicas através da relação com as variáveis ambientais. Com os resultados obtidos pela análise quimiométrica foi possível agrupar as amostras de óleos essenciais de *T. diversifolia* em quatro grupos diferentes, baseando-se no local de coleta da amostra (SP e GO) e na parte da planta utilizada para obtenção do óleo essencial (folhas e inflorescências), de forma que, com exceção de uma amostra de óleo essencial de folhas coletadas no estado de

São Paulo no mês de janeiro de 2013, as amostras se agruparam majoritariamente de acordo com o local de coleta, como pode ser visto na Figura 34.

Após a análise dos dados dos OE de *T. diversifolia* por PCA e OPLS-DA, foi possível definir as variáveis discriminantes para cada grupo. A Tabela 13 apresenta as variáveis discriminantes observadas para cada grupo de amostras de óleo essencial.

Figura 34. Plote da análise por HCA (método de Ward) para as amostras de óleos essenciais das folhas e inflorescências de *T. diversifolia* coletadas nos estados de Goiás e São Paulo, com proposta de agrupamento. Legenda: F = Folha; I = Inflorescência; S = São Paulo; G = Goiás. O sinal * indica uma amostra não agrupada com as demais amostras da sua localidade de coleta.

Figura 35. Biplot (scores x loadings) da análise por PCA para as amostras de óleos essenciais de *T. diversifolia* com proposta de agrupamento e identificação das variáveis discriminantes. Proposta de grupos: FSP (azul), FGO (verde), ISP (vermelho), IGO (amarelo). Legenda: F = Folha; I = Inflorescência; S = São Paulo; G = Goiás.

Figura 36. Score plot da análise por PCA para as amostras de óleos essenciais de folhas e inflorescências de *T. diversifolia* com proposta de agrupamento e relação com as variáveis ambientais. Proposta de grupos: FSP (azul), FGO (verde), ISP (vermelho), IGO (amarelo). Legenda: F = Folha; I = Inflorescência; S = São Paulo; G = Goiás; Ca = Cálcio; Cu = Cobre; P = Fósforo; Zn = Zinco.

Figura 37. Score plot da análise por OPLS-DA para as amostras de óleos essenciais de folhas e inflorescências de *T. diversifolia* com proposta de agrupamento. Proposta de grupos: FSP (azul), FGO (verde), ISP (vermelho), IGO (amarelo). Legenda: F = Folha; I = Inflorescência; S = São Paulo; G = Goiás.

Tabela 13: Variáveis discriminantes para os grupos de amostras dos óleos essenciais de *T. diversifolia*.

Grupo	Amostras de OE	Variáveis discriminantes
Folhas-GO	FG_Jan, FG_Mai, FG_Jun, FG_Jul, FG_Ago, FG_Dez	biciclogermacreno cariofileno <E-> óxido de cariofileno kessano
Folhas-SP	FS_Mai, FS_Jun, FS_Jul, FS_Ago, FS_Dez	β -pineno
Inflorescências-GO	IG_Mai, IG_Jun, IG_Jul, IG_Dez	α -pineno α -copaeno
Inflorescências-SP	IS_Mai, IS_Jun, IS_Jul	β -pineno NI-IR1161*
Folhas-SP-Jan	FS_Jan	α -pineno

*NI = Substância não identificada pela análise de CG-EM. IR = Índice de Retenção da substância.

4.4 Análise da variação regional dos metabólitos de *T. diversifolia*

A análise dos extratos de *T. diversifolia* preparados a partir do material coletado nas diferentes regiões geográficas do Brasil por UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS possibilitou a detecção de 563 picos no modo de ionização positivo e 530 picos no modo de ionização negativo, de forma que para a realização das análises multivariadas por HCA e PCA foram utilizados os dados obtidos no modo negativo.

Os dados de todas as partes da planta foram utilizados para a realização das análises multivariadas e os resultados da HCA e PCA, respectivamente, são apresentados pelo dendrograma da Figura 38 e o pelo gráfico do tipo *biplot* das amostras e variáveis representado na Figura 39.

Figura 38. Dendrograma da análise de HCA para os dados de UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS obtidos a partir dos extratos de *T. diversifolia* coletados em diferentes partes do Brasil com a proposta de agrupamento. F = Folhas; C = Caules; R = Raízes; I = Inflorescências; DF = Distrito Federa; GO = Goiás, PA = Pará; RN = Rio Grande do Norte; SC = Santa Catarina; SP = São Paulo; Os números representam o ano da coleta do material: 12 = 2012; 13 = 2013.

Figura 39. Gráfico do tipo *biplot* (*scores* x *loadings*) da PCA realizada com os dados de UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS obtidos a partir dos extratos de *T. diversifolia* coletados em diferentes partes do Brasil com a proposta de agrupamento. Os *scores* das amostras são representados pelos objetos coloridos de acordo com a proposta de agrupamento e as variáveis (*loadings*) pelos quadrados em cinza.

As Figuras 40 e 41 representam os *score plots* em dois e três eixos, respectivamente, obtidos pela análise de OPLS-DA dos dados de UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS para o estudo de variação regional.

Figura 40. Score plot (com dois eixos) da análise por OPLS-DA realizada com os dados de UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS obtidos a partir dos extratos de *T. diversifolia* coletados em diferentes partes do Brasil com a proposta de agrupamento.

Figura 41. Score plot (com três eixos) da análise por OPLS-DA realizada com os dados de UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS obtidos a partir dos extratos de *T. diversifolia* coletados em diferentes partes do Brasil com a proposta de agrupamento. Amostra de folhas coletada no Distrito Federal em 2012 é indicada na figura.

4.5 Desreplicação dos extratos por UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS

Os dados das análises dos extratos em UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS foram utilizados para a realização da etapa de desreplicação das variáveis discriminantes, sendo que os valores das massas de alta resolução obtidas para as substâncias presentes nos extratos foram comparados com os dados de massa de dois bancos de substâncias oriundas de espécies da família Asteraceae (LiNPA e TitDB) e com uma banco de dados geral para produtos naturais, o *Dictionary of Natural Products* (DNP) a fim de se obter informações que permitissem a identificação dos componentes dos extratos, ou pelo menos inferir a qual classe de metabólitos naturais estes componentes pertencem.

Utilizou-se também para a etapa de desreplicação os dados experimentais de alguns padrões analisados sob as mesmas condições que os extratos de *T. diversifolia*. A Tabela 14 apresenta os padrões que foram utilizados na etapa de desreplicação e a Tabela 15 apresenta os dados das substâncias identificadas, ou cuja classe de metabólitos a qual pertencem foi identificada, nos diferentes extratos de *T. diversifolia*.

Tabela 14: Padrões utilizados na etapa de desreplicação dos extratos de *T. diversifolia* por UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS.

Nº	Padrões	TR (min)	Massa monoisotópica
1	Ácido cafeico	9,80	180,04226
2	Ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico	8,30	354,09508
3	Ácido <i>p</i> -coumárico	12,51	146,03678
4	Ácido quínico	1,83	192,06339
5	Ácido ferúlico	13,75	194,05791
6	Rutina hidratada	12,99	610,15338
7	Quercetina	20,98	302,04265
8	Ácido protocatecuico	6,04	154,02661
9	Ácido 3,5- <i>O</i> -dicafeoilquínico	15,36	516,12677
10	Ácido 4,5- <i>O</i> -dicafeoilquínico	14,80	516,12677
11	Ácido 3,4- <i>O</i> -dicafeoilquínico	16,49	516,12677
12	Tagitinina C	24,84	348,15729
13	Budleína A	22,49	374,13655
14	Quercetrina	15,59	448,10056
15	Afzelina	17,94	432,10565
16	Ácido 4- <i>O</i> -cafeoil-2- <i>C</i> -metil-D-treônico	11,97	312,08451

Foi possível neste trabalho, desreplicar 55 substâncias discriminantes, sendo que para 26 componentes dos extratos foi possível realizar a identificação exata das substâncias e para os demais foi possível se determinar a classe as quais pertenciam.

Tabela 15: Substâncias identificadas nos extratos de *T. diversifolia* dentre as variáveis discriminantes determinadas pela análise quimiométrica, após desreplicação em UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS.

Nº	FM	Massa monoisotópica	Substância sugerida	TR (min)	Observação	Parte da planta
1	C ₆ H ₁₂ O ₇	196,0575	<i>Hamamelonic acid (D-form)</i>	1,80	-	F; C; R; I
2	C ₅ H ₁₃ O ₇ P	216,0395	2-metil-1,2,3,4-butanetetrol; (2S,3R)-4-fosfato	1,80	Intermediário específico da via do metileritritol fosfato para biossíntese de isoprenoides	F; C; R; I
3	C ₆ H ₁₂ O ₆	180,0634	Hexose	1,84	açúcar	F; C; R; I
4	C ₇ H ₁₂ O ₆	192,0634	Ácido quínico	1,84	-	F; C; R; I
5	C ₇ H ₁₂ O ₇	208,0578	Ácido metilglicurônico	1,99	-	F; C; R; I
6	C ₆ H ₈ O ₇	192,0265	Ácido cítrico	2,07	-	F; C; R; I
7	C ₇ H ₆ O ₄	154,0266	Ácido protocatecuico	6,05	comparação com padrão puro	F; C; I
8	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354,0951	derivado <i>trans</i> -cinâmico	6,30	UV = 324, 301sh, 247 nm	F; C; R; I
9	C ₇ H ₁₂ O ₆	192,0367	Ácido quínico	8,30	Fragmentação do ácido clorogênico	F; C; R; I
10	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354,0951	Ácido clorogênico (5- <i>O</i> - cafeoilquínico)	8,32	comparação com padrão puro	F; C; R; I
11	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354,0951	Derivado <i>trans</i> -cinâmico	8,77	UV = 326, 300sh, 221 nm	F; C; R; I
12	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₄	534,1018	Derivado <i>trans</i> -cinâmico	9,77	UV = 323, 300sh, 248 nm	F; C; R; I
13	C ₉ H ₈ O ₄	180,0415	Ácido cafeico	9,80	comparação com padrão puro	F; C; R; I
14	C ₁₄ H ₁₆ O ₈	312,0845	Ácido 4- <i>O</i> -cafeoil-2- <i>C</i> -metil-D- treônico	11,90	comparação com padrão puro	F
15	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610,1537	Rutina	12,90	comparação com padrão puro	I
16	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464,0960	Isoquercetrina	13,75	UV = 364, 342sh, 260 nm	F; I
17	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₃	494,1060	Flavonoide glicosilado	14,00	UV = 354, 347, 293, 258 nm	F
18	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	516,1268	Ácido 4,5- <i>O</i> -dicafeoilquínico	14,80	comparação com padrão puro	F; C; R; I

19	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	516,1268	Ácido 3,5- <i>O</i> -dicafeoilquínico	15,40	comparação com padrão puro	F; C; R; I
20	C ₃₃ H ₂₈ O ₁₇	696,1336	Derivado <i>trans</i> -cinâmico	15,50	UV = 328, 303sh, 247 nm	C; R
21	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	448,1010	Quercetrina	15,65	comparação com padrão puro	F; R; I
22	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	516,1273	Derivado dicafeoilquínico	15,90	UV = 327, 300, 253 nm	F; C; R; I
23	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₅	550,0967	Flavonoide glicosilado	16,00	UV = 368, 348, 255 nm	F; I
24	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	516,1268	Ácido 3,4- <i>O</i> -dicafeoilquínico	16,60	comparação com padrão puro	F; C; R; I
25	C ₃₃ H ₂₈ O ₁₇	696,6340	Derivado <i>trans</i> -cinâmico	16,90	UV = 328, 304sh, 245, 216	R
26	C ₃₃ H ₂₈ O ₁₇	696,1323	Derivado <i>trans</i> -cinâmico	17,30	UV = 328, 303sh, 248	C; R
27	C ₄₃ H ₃₈ O ₁₉	858,1656	Derivado <i>trans</i> -cinâmico	20,30	UV = 328, 304sh, 244	C; R
28	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286,0480	Luteolina	20,90	UV = 346, 266, 254	F; C; I
29	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302,0428	Quercetina	21,02	comparação com padrão puro	I
30	C ₃₄ H ₃₇ N ₃ O ₇	599,2637	<i>Spermidine; N'-(3,4-Dihydroxycinnamoyl), N,N''-bis(4-hydroxycinnamoyl)</i>	21,10	UV = 306, 294	I
31	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	316,0583	Nepetina	21,20	UV = 346, 271, 255	F; C; I
32	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	316,0583	Flavonoide	21,30	UV = 346, 269, 256 nm	F; C; I
33	C ₁₉ H ₂₆ O ₇	366,1679	Tagitinina B ou 4,8,10-Trihydroxy-3-oxo-11(13)-guaien-12,6-olide; (1 α ,4 β ,5 α ,6 α ,8 β ,10 β)-form, 8- <i>O</i> -(2-Methylpropanoyl)	21,30	-	F; C; I
34	C ₁₉ H ₂₈ O ₇	368,1835	Tagitinina A ou 2 α -hidoxitirobundina	21,80	-	F; C; I
35	C ₃₄ H ₃₇ N ₃ O ₆	583,2682	<i>Spermidine; N,N',N''-Tris(4-hydroxy-E-cinnamoyl)</i>	22,40	UV = 306, 294	I
36	C ₁₉ H ₂₈ O ₇	368,1835	Tagitinina A ou 2 α -hidoxitirobundina	22,70	-	F; C; I

37	C ₁₉ H ₂₆ O ₇	366,1679	Tagitinina B ou 4 α ,10 α -dihydroxy-8 β -isobutyroyloxy-3-oxoguai-11(13)-en-6 α ,12-olide	22,70	-	F; C; I
38	C ₄₆ H ₅₀ N ₄ O ₉	802,3588	Monocaffeoyl-tri-p-coumaroyl spermine	23,05	UV = 305, 297	I
39	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270,0525	Apigenina	23,45	UV = 338, 266 nm	F
40	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	300,0634	Hispidulina	23,80	UV = 335, 273 nm	F; C; R
41	C ₄₆ H ₅₀ N ₄ O ₈	786,3629	Spermine; N1,N5,N10,N14-Tetrakis(4-hydroxy-E-cinnamoyl)	24,00	UV = 305, 297	I
42	C ₁₈ H ₃₂ O ₅	328,2252	Phytopropane F1 type I	24,13	UV = 203 nm	F; C; I
43	C ₁₉ H ₂₆ O ₇	366,1679	Tagitinina B ou 4 α ,10 α -dihydroxy-8 β -isobutyroyloxy-3-oxoguai-11(13)-en-6 α ,12-olide	24,77	-	F; C; I
44	C ₁₉ H ₂₄ O ₆	348,1573	Tagitinina C	24,90	comparação com padrão puro	F; C; I
45	C ₁₉ H ₂₆ O ₆	350,1729	Tagitinina E ou diversifolina	24,90	-	F; C; I
46	C ₂₀ H ₂₈ O ₇	380,1835	2-O-metiltagitina B ou 3,10-Epoxy-1,3,8-trihydroxy-4,11(13)-germacradien-12,6-olide; (1 β ,3 α ,4Z,6 α ,8 β)-form, 3-Me ether, 8-O-(2-methylpropanoyl)	25,30	-	F; C; I
47	C ₁₂ H ₂₀ O ₄	228,1359	Ácido graxo hidroxilado	25,30	-	F
48	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	330,2409	Ácido graxo hidroxilado	25,50	-	F; C; R; I
49	C ₁₉ H ₂₆ O ₇	366,1680	LST	26,50	-	F; I
50	C ₂₀ H ₂₆ O ₆	362,1729	LST	27,30	-	F; C; I
51	C ₂₀ H ₂₆ O ₆	362,1731	LST	27,60	UV = 223 nm	F; I
52	C ₁₈ H ₃₂ O ₄	312,2303	Ácido graxo hidroxilado	30,40	UV = 224 nm	C; R; I
53	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	294,2198	Derivado de ácido graxo	30,80	-	F; R; I
54	C ₂₇ H ₄₆ O ₉	514,3142	Triterpeno ou derivado de ácido graxo	31,30	UV = 227 nm	F; R
55	C ₂₀ H ₄₀ O ₄	344,2926	Derivado de ácido graxo	34,60	-	F; R. I

4.6 Avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

A partir dos dados obtidos pela análise multivariada realizada com os extratos de *T. diversifolia* destinados ao estudo da variação sazonal dos metabólitos e influência dos fatores ambientais, foi realizada a seleção de uma amostra de cada parte da planta (folhas, caules, raízes e inflorescências), pertencente aos agrupamentos caracterizados pelo acúmulo de substâncias fenólicas, seguindo os critérios descritos no item 3.7.1, para a realização dos ensaios para avaliação da atividade antioxidante *in vitro*. Os extratos selecionados foram preparados a partir das amostras FG1213, RS913, CG1213 e IG114, e submetidos a uma avaliação preliminar pelo ensaio da atividade sequestrante de radicais livres pelo método do DPPH, sendo que os resultados obtidos são apresentados na Tabela 16.

Os resultados obtidos pelo teste do DPPH foram utilizados como critério para seleção dos extratos mais ativos, sendo que os extratos que apresentaram valor de CE_{50} menor que 10,0 $\mu\text{g/mL}$ foram selecionados para a realização dos demais ensaios para avaliação da atividade antioxidante. Os resultados obtidos pelos diferentes métodos de avaliação da atividade antioxidante são apresentados na Tabela 17.

Tabela 16: Valores de CE_{50} e PAR obtidos para os extratos de *T. diversifolia* utilizados na avaliação da atividade antioxidante pelo ensaio do DPPH.

Extratos	EC_{50} - DPPH ($\mu\text{g/mL}$)	PAR*	Extratos	EC_{50} - DPPH ($\mu\text{g/mL}$)	PAR
CG1213	15,50	0,065	FS912	12,45	0,080
CG213	15,49	0,065	IG114	12,03	0,083
CG412	32,61	0,031	IG1212	23,08	0,043
CS113	20,82	0,048	IG712	66,68	0,015
CS114	19,96	0,050	IS1013	19,77	0,051
CS812	39,22	0,025	RG1113	13,75	0,073
FG1213	7,21	0,139	RG113	19,26	0,052
FG412	12,88	0,078	RG412	75,00	0,013
FG413	36,66	0,027	RG813	16,31	0,061
FS113	17,64	0,057	RS313	33,76	0,030
FS512	29,79	0,034	RS812	26,72	0,037
FS612	75,00	0,013	RS913	6,36	0,157

*PAR = Poder Antirradicalar.

Tabela 17: Valores de CE_{50} (expressos em $\mu\text{g/mL}$) obtidos com os diferentes ensaios para avaliação da atividade antioxidante para os extratos de *T. diversifolia*.

Ensaio	FG1213	RS913	CG1213	IG114
DPPH	7,21	6,36	15,50	12,03
Quimiluminescência	1,20	1,24	-	-
Peroxidação lipídica	1035,37	1606,06	-	-

4.7 Ensaios para avaliação da fotoproteção e fototoxicidade dos extratos de *T. diversifolia* em cultura de células

4.7.1 Avaliação da toxicidade celular (*in vitro*) pelo ensaio de incorporação do Vermelho Neutro

Após os ensaios para avaliação da toxicidade celular (*in vitro*) pelo método de incorporação do vermelho neutro, foi possível determinar o valor de CI_{50} do extrato FG1213, para ambas as linhagens celulares testadas, enquanto o extrato RS913 não apresentou toxicidade em nenhuma das concentrações testadas até um máximo de 400,0 $\mu\text{g/mL}$.

Os valores de CI_{50} para o extrato FG1213 em fibroblasto L929 e queratinócito HaCaT são, respectivamente, 79,0 $\mu\text{g/mL}$ e 27,4 $\mu\text{g/mL}$. Os gráficos de regressão sigmoidal do tipo dose resposta obtidos no ensaio de toxicidade celular para o extrato FG1213 em ambas as linhagens celulares são mostrados nas Figuras 42 e 43.

Figura 42. Gráfico de regressão sigmoidal (dose-resposta) da concentração x viabilidade celular para o extrato FG1213 em fibroblasto L929. Valor de $r^2 = 0,99047$.

Figura 43. Gráfico de regressão sigmoidal (dose-resposta) da concentração x viabilidade celular para o extrato FG1213 em queratinócito HaCaT. Valor de $r^2 = 0,99987$.

4.7.2 Avaliação *in vitro* da eficácia fotoprotetora dos extratos por medida da viabilidade das células expostas à radiação UV-B

Os resultados obtidos após a realização dos ensaios para avaliação da atividade fotoprotetora dos extratos FG1213 e RS913 pela medida da viabilidade celular dos fibroblastos L929 e queratinócitos HaCaT expostos à radiação UV-B e realização da análise estatística adequada são apresentados nas Figuras 44 e 45.

Figura 44. Atividade fotoprotetora dos extratos FG1213 e RS913 *in vitro* medida pela viabilidade celular (%) em cultura de fibroblastos L929 expostos a 0,5 J/cm² de radiação UV-B. CNI = Controle não irradiado; CI = Controle irradiado, C+ = Protetor solar comercial FPS 30 (controle positivo); V = Veículo; F = Extrato FG1213; R = Extrato RS913. As letras a e b no gráfico expressam a diferença estatisticamente significativa em comparação com o controle irradiado ou com o controle positivo, respectivamente, ambos pelo teste de variância ANOVA fator único, seguido por Turkey, com $p < 0,05$. Os *** no gráfico expressam a diferença estatisticamente significativa em comparação com o controle não irradiado para os demais grupos, ambos pelo teste de variância ANOVA fator único, seguido por Turkey, com $p < 0,001$.

Figura 45. Atividade fotoprotetora dos extratos FG1213 e RS913 *in vitro* medida pela viabilidade celular (%) em cultura de queratinócitos HaCaT expostos a 0,5 J/cm² de radiação UV-B. CNI = Controle não irradiado; CI = Controle irradiado, C+ = Protetor solar comercial FPS 30 (controle positivo); V = Veículo; F = Extrato FG1213; R = Extrato RS913. As letras a e b no gráfico expressam a diferença estatisticamente significativa em comparação com o controle irradiado ou com o controle positivo, respectivamente, ambos pelo teste de variância ANOVA fator único, seguido por Turkey, com $p < 0,05$. Os *** no gráfico expressam a diferença estatisticamente significativa em comparação com o controle não irradiado para os demais grupos, ambos pelo teste de variância ANOVA fator único, seguido por Turkey, com $p < 0,001$.

4.7.3 Avaliação *in vitro* da eficácia fotoprotetora dos extratos por medida da quantidade de espécies reativas de oxigênio (EROs) induzidas pela exposição à radiação UV-A

Os resultados obtidos após a realização dos ensaios para avaliação da atividade fotoprotetora dos extratos FG1213 e RS913 pela medida da quantidade de espécies reativas de oxigênio (EROs) induzidas pela exposição a radiação UV-A em cultura de fibroblastos L929 e queratinócitos HaCaT e realização da análise estatística adequada são apresentados nas Figuras 46 e 47.

Figura 46. Atividade fotoprotetora dos extratos FG1213 e RS913 *in vitro* medida pela quantidade de EROs (expressa por unidade de emissão de fluorescência – UEF) formada em cultura de fibroblastos L929 expostos a 10 J/cm² de radiação UV-A. CNI = Controle não irradiado; CI = Controle irradiado, C+ = Protetor solar comercial FPS 30 (controle positivo); V = Veículo; F = Extrato FG1213; R = Extrato RS913. As letras a e b no gráfico expressam a diferença estatisticamente significativa em comparação com o controle irradiado ou com o controle positivo, respectivamente, e a letra c a diferença estatisticamente significativa entre os extratos FG1213 e RS913, todos pelo teste de variância ANOVA fator único, seguido por Turkey, com $p < 0,05$. Os *** no gráfico expressam a diferença estatisticamente significativa em comparação com o controle não irradiado para os demais grupos, ambos pelo teste de variância ANOVA fator único, seguido por Turkey, com $p < 0,001$.

Figura 47. Atividade fotoprotetora dos extratos FG1213 e RS913 *in vitro* medida pela quantidade de EROs (expressa por unidade de emissão de fluorescência – UEF) formada em cultura de queratinócitos HaCaT expostos a 10 J/cm² de radiação UV-A. CNI = Controle não irradiado; CI = Controle irradiado, C+ = Protetor solar comercial FPS 30 (controle positivo); V = Veículo; F = Extrato FG1213; R = Extrato RS913. As letras a e b no gráfico expressam a diferença estatisticamente significativa em comparação com o controle irradiado ou com o controle positivo, respectivamente, e a letra c a diferença estatisticamente significativa entre os extratos FG1213 e RS913, todos pelo teste de variância ANOVA fator único, seguido por Turkey, com $p < 0,05$. Os *** no gráfico expressam a diferença estatisticamente significativa em comparação com o controle não irradiado para os demais grupos, ambos pelo teste de variância ANOVA fator único, seguido por Turkey, com $p < 0,001$.

4.7.4 Avaliação *in vitro* da fototoxicidade dos extratos pela medida da viabilidade das células expostas a radiação UV-B

Os resultados obtidos após a realização dos ensaios para avaliação da fototoxicidade dos extratos FG1213 e RS913 pela medida da viabilidade celular dos fibroblastos L929 e queratinócitos HaCaT expostos à radiação UV-B e realização da análise estatística adequada são apresentados nas Figuras de 48 a 51.

Figura 48. Avaliação da fototoxicidade do extrato FG1213 *in vitro*, utilizando-se cinco concentrações diferentes, medida pela viabilidade celular (%) em cultura de fibroblastos L929 expostos a 0,6 J/cm² de radiação UV-B. CNI = Controle não irradiado; CI = Controle irradiado; V = Veículo. As letras a e b no gráfico expressam a diferença estatisticamente significativa em comparação com o controle não irradiado ou com o controle irradiado, respectivamente, ambos pelo teste de variância ANOVA fator único, seguido por Turkey, com $p < 0,001$ para a e $p < 0,05$ para b.

Figura 49. Avaliação da fototoxicidade do extrato RS913 *in vitro*, utilizando-se cinco concentrações diferentes, medida pela viabilidade celular (%) em cultura de fibroblastos L929 expostos a 0,6 J/cm² de radiação UV-B. CNI = Controle não irradiado; CI = Controle irradiado; V = Veículo. A letra a no gráfico expressa a diferença estatisticamente significativa em comparação com o controle não irradiado pelo teste de variância ANOVA fator único, seguido por Turkey, com $p < 0,001$.

Figura 50. Avaliação da fototoxicidade do extrato FG1213 *in vitro*, utilizando-se cinco concentrações diferentes, medida pela viabilidade celular (%) em cultura de queratinócitos HaCaT expostos a 0,3 J/cm² de radiação UV-B. CNI = Controle não irradiado; CI = Controle irradiado; V = Veículo. As letras a e b no gráfico expressam a diferença estatisticamente significativa em comparação com o controle não irradiado ou com o controle irradiado, respectivamente, ambos pelo teste de variância ANOVA fator único, seguido por Turkey, com $p < 0,05$.

Figura 51. Avaliação da fototoxicidade do extrato RS913 *in vitro*, utilizando-se cinco concentrações diferentes, medida pela viabilidade celular (%) em cultura de queratinócitos HaCaT expostos a 0,3 J/cm² de radiação UV-B. CNI = Controle não irradiado; CI = Controle irradiado; V = Veículo. A letra a no gráfico expressa a diferença estatisticamente significativa em comparação com o controle não irradiado pelo teste de variância ANOVA fator único, seguido por Turkey, com $p < 0,001$.

4.7.5 Avaliação *in vitro* da eficácia fotoquimiopreventiva dos extratos pelo ensaio de geração de peróxidos lipídicos em cultura de células após a exposição à radiação UV-B

Os resultados obtidos após a realização dos ensaios para avaliação *in vitro* da eficácia fotoquimiopreventiva dos extratos pelo ensaio de geração de peróxidos lipídicos em cultura de fibroblastos L929 e queratinócitos HaCaT expostos à radiação UV-B e realização da análise estatística adequada são apresentados nas Figuras 52 e 53.

Figura 52. Atividade fotoquimiopreventiva dos extratos FG1213 e RS913 *in vitro* medida pela quantidade de MDA (expressa em nM de MDA/ μ g de proteínas totais) formado em cultura de fibroblastos L929 expostos a 30,0 J/cm² de radiação UV-B. CNI = Controle não irradiado; CI = Controle irradiado; V = Veículo; F = Extrato FG1213; R = Extrato RS913. Os *** no gráfico expressam a diferença estatisticamente significativa em comparação com o controle não irradiado pelo teste de variância ANOVA fator único, seguido por Turkey, com $p < 0,001$.

Figura 53. Atividade fotoquimiopreventiva dos extratos FG1213 e RS913 *in vitro* medida pela quantidade de MDA (expressa em nM de MDA/ μ g de proteínas totais) formado em cultura de queratinócitos HaCaT expostos a 7,5 J/cm² de radiação UV-B. CNI = Controle não irradiado; CI = Controle irradiado; V = Veículo; F = Extrato FG1213; R = Extrato RS913. A letra a no gráfico expressa a diferença estatisticamente significativa em comparação com o controle irradiado pelo teste de variância ANOVA fator único, seguido por Turkey, com $p < 0,001$. Os *** no gráfico expressam a diferença estatisticamente significativa em comparação com o controle não irradiado pelo teste de variância ANOVA fator único, seguido por Turkey, com $p < 0,001$.

5 DISCUSSÃO

A partir dos resultados obtidos é possível fazer algumas considerações acerca das características químicas de *T. diversifolia*, sobre o perfil metabólico dos diferentes extratos e óleos essenciais estudados, assim como sobre a relação desses metabólitos na planta com os fatores ambientais observados e como a variação em sua produção afeta a atividade biológica dos extratos.

A análise fitoquímica do extrato EAF demonstrou a presença de substâncias das três principais classes de metabólitos secundários (LST, ésteres do ácido cafeico e flavonoides) neste extrato, com destaque para as LST, pois foi possível se realizar o isolamento das tagitininas A e C, e para o derivado cafeico isolado, ácido 4-*O*-cafeoil-2-*C*-metil-D-treônico, o qual foi descrito pela primeira vez na espécie.

O isolamento e identificação das substâncias tagitinina A e C na FBEAF demonstra como as LST são abundantes nas folhas de *T. diversifolia*, pois mesmo que o processo de extração por infusão utilize um solvente altamente polar como a água, ele é capaz de extrair essas substâncias de menor polaridade, principalmente a tagitinina C, que já é descrita como presente nos mais diversos extratos de folhas de *T. diversifolia*, sendo um dos componentes mais abundantes nas folhas da espécie (AMBRÓSIO et al., 2008; GOFFIN et al., 2002; GU et al., 2002; KURODA et al., 2007).

Dentre as substâncias isoladas a partir do extrato EAF, o ácido 4-*O*-cafeoil-2-*C*-metil-D-treônico foi o resultado mais interessante, uma vez que tal substância ainda não havia sido descrita para *T. diversifolia*, e foi descrita somente para a espécie *Viguiera pazensis* Rusby por Uriburu et al. (2008).

A identificação da substância FBEAF 7.25 como ácido 4-*O*-cafeoil-2-*C*-metil-D-treônico foi possível pela obtenção do valor da massa exata por espectrometria de massas de alta resolução, com a qual foi possível se obter a fórmula molecular da substância (C₁₄H₁₆O₈), e pela comparação dos espectros de RMN unidimensionais de ¹H e ¹³C, assim como dos bidimensionais do tipo *HSQC* e *HMBC* com a literatura. Outro fator de extrema importância para a identificação desta substância foi a obtenção do derivado lactônico FBEAF 7.25-lac, identificado como 3-*O*-cafeoil-2-*C*-metil-D-treono-1,4-lactona, após reação em meio ácido (CF₃COOH 1M em H₂O), uma vez que através da análise dos espectros de RMN obtidos deste derivado, principalmente os do tipo *HMBC*, foi possível determinar a estrutura da porção ligada ao resíduo de ácido cafeico como 2-*C*-metil-D-treonato.

Para se determinar a estrutura exata da porção da molécula ligada ao resíduo de ácido cafeico a partir do derivado lactônico FBEAF 7.25-lac, utilizou-se o valor da constante de acoplamento entre os núcleos do carbono metílico C-5' e do hidrogênio H-3' localizados no anel lactônico a uma distância de três ligações entre si (3J) em que foi possível observar melhor o sinal do acoplamento entre os núcleos através de experimentos de RMN bidimensional do tipo *HMBC*, obtendo-se espectros com valores de acoplamento ^1H - ^{13}C (3J) iguais a 5,0, 8,0 e 12,0 Hz (APÊNDICES R, S e T, respectivamente).

Considerando-se que para um anel lactônico de cinco membros como o observado na estrutura da substância FBEAF 7.25-lac, a constante de acoplamento 3J teórica do núcleo do hidrogênio H-3' com o do carbono metílico C-5' (baseando-se na Relação de Karplus) seria de aproximadamente 9,5 Hz caso os dois núcleos formassem um ângulo diedro α próximo de 0° e de aproximadamente 6,9 Hz para um ângulo diedro α próximo de 60° (PAVIA et al., 2010; PRESTCH; BÜHLMANN; BADERTSCHER, 2009; SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000), observou-se um sinal mais intenso no espectro de RMN do tipo *HMBC* obtido com valores de J igual a 5,0 Hz, sendo que no espectro obtido com valor de J igual a 8,0 Hz também é possível observar o sinal resultante do acoplamento entre H-3' e C-5', contudo em menor intensidade, enquanto que para o espectro obtido com o valor de J igual a 12,0 Hz não foi possível observar o sinal do acoplamento entre H-3' e C-5', o que indica que os dois núcleos atômicos estão em posições alternadas no anel lactônico.

Os resultados obtidos pela análise de RMN do tipo *HMBC* para o derivado FBEAF 7.25-lac indicam que a substância isolada FBEAF 7.25 possui a porção 2-*C*-metil-treonato ligada ao resíduo de ácido cafeico, e não o seu isômero 2-*C*-metil-eritronato, o qual já havia sido descrito para alguns derivados cafeoil isolados de *Bidens pilosa* L. (OGAWA; SASHIDA, 1992).

O isolamento da substância ácido 4-*O*-cafeoil-2-*C*-metil-D-treônico em *T. diversifolia* indica que este tipo de derivado do ácido cafeico pode ser utilizado como marcador quimiossistemático para espécies da tribo Heliantheae, uma vez que esta substância já havia sido isolada de *V. pazensis*, uma espécie do gênero *Viguiera* que também pertence à tribo Heliantheae, assim como o gênero *Tithonia*, de forma que os ésteres do ácido cafeico com derivados do ácido D-treônico podem ser característicos de espécies desta tribo de plantas da família Asteraceae.

A análise fitoquímica do extrato aquoso das inflorescências de *T. diversifolia* permitiu o isolamento de um bom número de substâncias (6 no total) apenas na fração AcOEt

deste extrato, o que demonstra a presença de uma variedade de substâncias polares nas inflorescências de *T. diversifolia*.

Há pouca informação disponível na literatura sobre substâncias isoladas das inflorescências de *T. diversifolia*, sendo que a grande maioria são aquelas de média a baixa polaridade, principalmente pertencentes a classe das LST, como descrito em artigo de revisão sobre o gênero *Tithonia* por Chagas-Paula et al. (2012) ou no estudo publicado por Ambrósio et al. (2008). Apesar da escassa literatura sobre os constituintes químicos das inflorescências de *T. diversifolia*, foi possível realizar a identificação das seis substâncias isoladas do EAI por comparação com dados da literatura, sendo elas o ácido protocatecuico, o ácido cafeico e seus derivados cafeoilquínicos, os quais são comumente encontrados em plantas da família Asteraceae, sendo o grupo dos dicafeoilquínicos característico para essa família de plantas (CLIFFORD, 2000).

A presença dos ácidos protocatecuico, 5-*O*-cafeoilquínico e 3,5-*O*-dicafeoilquínico em *T. diversifolia* já é conhecida, sendo que estas substâncias foram todas isoladas a partir de extratos obtidos das folhas da planta (CHAGAS-PAULA et al., 2011; ZHAO et al., 2012b), contudo, não haviam sido isoladas a partir de extratos das inflorescências. O ácido cafeico e os demais derivados cafeoilquínicos (3,4-*O*-dicafeoilquínico e 4,5-*O*-dicafeoilquínico) isolados do extrato EAI são descritos pela primeira vez para a espécie, desta forma acrescentando novas informações acerca da composição química do margaridão.

Observa-se que as substâncias isoladas a partir do EAI são metabólitos secundários polares abundantes nas inflorescências de *T. diversifolia*, sendo o ácido 3,5-*O*-dicafeoilquínico aparentemente o mais abundante, o que possibilitou o isolamento de uma quantidade significativa do mesmo, cerca de 92,0 mg, a partir de 1,0 g de fração FAEI do extrato, destacando-se também os ácidos 3,4-*O*-dicafeoilquínico e 4,5-*O*-dicafeoilquínico, que apesar de terem sido isolados em menor quantidade a partir da mesma fração do extrato EAI, indicam a existência de outros derivados dicafeoilquínicos em *T. diversifolia*.

A análise dos óleos essenciais de *T. diversifolia* obtidos em diferentes meses por CG-EM proporcionou uma visão geral dos principais componentes voláteis encontrados nas folhas e inflorescências desta planta, sendo que foi possível observar, pelos resultados obtidos, o predomínio de monoterpenos como componentes majoritários de todas as amostras analisadas de OE (principalmente os monoterpenos hidrocarbônicos). Outro fato interessante observado pela análise dos óleos essenciais é a presença (mesmo que em pequena proporção) de algumas substâncias que não pertencem ao grupo dos terpenos, como ácidos graxos,

aldeídos, éteres cíclicos e hidrocarbonetos, sendo que a grande maioria foi encontrada nas amostras de óleos essenciais das inflorescências.

De forma geral, os OE das inflorescências apresentaram uma maior diversidade de componentes químicos do que os OE das folhas, contudo, essa diferença na composição não se reflete em uma diferença entre os principais componentes majoritários desses óleos, sendo que monoterpenos como o α - e β -pineno são os componentes mais abundantes em praticamente todos os OE, com exceção dos OE obtidos das folhas de *T. diversifolia* coletadas no estado de GO, no qual apenas o α -pineno se apresenta como um dos componentes majoritários, sendo que alguns sesquiterpenos (hidrocarbônicos e oxigenados) aparecem também como majoritários nas amostras de OE, em especial o cariofileno <E->, o óxido de cariofileno e o biciclogermacreno.

Os resultados obtidos pela análise dos OE de *T. diversifolia* obtidos de espécimes localizados em diferentes regiões do Brasil e coletados em diferentes épocas demonstram que a produção dos constituintes voláteis nas folhas e inflorescências desta espécie é dependente principalmente do ambiente no qual a planta se desenvolve, uma vez que outros estudos realizados para se determinar a constituição química dos óleos essenciais desta espécie também indicam essa variação de acordo com o local de obtenção das amostras.

Os trabalhos realizados por Lamaty et al. (1991) e por Menut et al. (1992), nos quais os autores descrevem a composição química dos óleos essenciais de folhas e inflorescências *T. diversifolia*, obtidos de amostras coletadas em Camarões, para os quais, os componentes majoritários dos OE são o β -ocimeno <Z-> (40,2% para o OE das folhas, e 15,5% e 21,4% para as amostras de inflorescências), e o α -pineno (25,0% para o OE das folhas, e 61,0% e 50,8% para as amostras de inflorescências), com os sesquiterpenos somando apenas 8,0% dos constituintes do óleo essencial das folhas. Em estudo realizado por Moronkola et al. (2006), analisou-se a composição dos óleos essenciais de amostras de folhas e inflorescências de *T. diversifolia* coletadas na Nigéria, obtendo-se como componentes majoritários do OE das folhas o monoterpeno α -pineno (32,9%) e o sesquiterpeno cariofileno <E-> (20,8%), e do OE das inflorescências os sesquiterpenos germacreno D (20,3%) e cariofileno <E-> (20,1%).

Os diferentes resultados descritos na literatura tanto para a composição dos óleos essenciais de folhas e inflorescências de *T. diversifolia* quanto para a proporção dos constituintes majoritários nestes óleos, somado aos resultados obtidos no presente trabalho, indicam que o ambiente no qual a planta se encontra parece influenciar de forma significativa a produção e o acúmulo dos constituintes voláteis em suas partes aéreas, o que pode ser útil

do ponto de vista ecológico na caracterização de populações desta espécie que se encontrem em locais com condições ambientais diferentes.

Outro resultado interessante apresentado neste estudo foi a diferença observada entre os óleos essenciais das duas populações de origem após a realização das análises de HCA e PCA, de forma que foi possível separá-los de acordo com o local de coleta, os estados de São Paulo e Goiás, ou seja, a partir destes dados foi possível observar a existência de diferentes quimiotipos de *T. diversifolia* quanto a composição do óleo essencial de acordo com a origem geográfica.

A existência de quimiotipos para espécies de plantas produtoras de OE é comum e bem reportada na literatura, como por exemplo, para a espécie *Lippia origanoides* a qual, em estudo realizado com diferentes populações coletadas na Colômbia, pôde ser classificada em três diferentes quimiotipos de acordo com a composição de seu óleo essencial (STASHENKO et al., 2010), ou *Origanum syriacum* L. coletada a partir de 11 populações na Síria e que apresentou, após a análise da composição dos óleos essenciais, a existência de três diferentes quimiotipos para a espécie (LUKAS et al., 2009).

Para *T. diversifolia*, podemos observar a existência de dois quimiotipos de acordo com o local de origem: um quimiotipo de Goiás e outro de São Paulo. O quimiotipo goiano, baseado no resultado da análise de PCA, é caracterizado pelos seguintes componentes do OE das folhas: biciclogermacreno, *E*-cariofileno, óxido de cariofileno e kessano; e do OE das inflorescências: α -pineno e α -copaeno. O quimiotipo paulista é caracterizado pela presença do seguinte componente majoritário para ambos os OE, folhas e inflorescências: β -pineno.

A classificação das amostras de *T. diversifolia* em quimiotipos pode ser importante do ponto de vista ecológico, uma vez que possibilita a caracterização de diferentes populações para esta espécie baseando-se na composição dos óleos essenciais das folhas e inflorescências. Assim, mostra-se interessante uma análise mais ampla das características químicas dos óleos essenciais de *T. diversifolia*, utilizando um maior número de amostras oriundas de diferentes regiões, uma vez que esta é uma espécie amplamente distribuída pelo mundo e que outros trabalhos descrevendo a composição dos óleos essenciais das folhas e inflorescências de espécimes de margaridão coletados em dois diferentes países africanos (Camarões e Nigéria) apresentam diferenças quali e quantitativas importantes para os principais componentes destes óleos (LAMATY et al., 1991; MENUT et al., 1992; MORONKOLA et al., 2006), ou seja, este tipo de estudo pode ajudar na caracterização das populações da espécie nos diferentes ecossistemas nos quais ela pode ser encontrada.

Com base nos resultados, é possível fazer algumas considerações sobre as características químicas dos extratos de *T. diversifolia* e a influência dos fatores ambientais sobre seu metabolismo, tendo em conta as variações no perfil metabólico observadas principalmente pela ocorrência de metabólitos principais em várias partes da planta. Portanto, os resultados deste estudo certamente acrescentam informações novas e relevantes sobre a variação sazonal das principais classes de metabólitos encontrados em *T. diversifolia* e sua relação com o ambiente circundante.

Dentre os fatores ambientais monitorados neste estudo, os fatores climáticos, que incluem temperatura, precipitação, umidade e radiação solar, bem como macro e micronutrientes do solo, demonstraram estar correlacionados com variações na produção de metabólitos primários e secundários de *T. diversifolia*. Um aspecto interessante que pôde ser observado é que estes fatores não parecem exercer uma influência uniforme em todo o metabolismo da planta, de modo que cada parte da planta responde diferentemente às mudanças nos fatores ambientais. Além disso, é importante salientar que outros fatores ambientais relacionados às condições do solo das duas regiões de cultivo não demonstraram uma influência significativa sobre o perfil metabólico da planta.

Baseado nos resultados das análises de PCA e HCA realizadas com dados concatenados obtidos por UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS e RMN do tipo *J-resolved*, foi possível propor grupos, de acordo com os perfis metabólicos das amostras e da relação com os dados ambientais monitorados, para as diferentes partes da planta da seguinte forma: amostras de folhas – quatro grupos com um *outlier* (Figuras 18 e 19); amostras de caules – quatro grupos com dois *outliers* (Figuras 22 e 23); amostras de raízes – três grupos (Figuras 26 e 27); e amostras de inflorescências – dois grupos com um *outlier* (Figuras 30 e 31).

A proposta de agrupamento dos diferentes extratos *T. diversifolia* mostrou que, a variação no perfil metabólico das folhas e caules parece estar relacionada principalmente com os níveis de precipitação e umidade, com temperatura e radiação solar também exercendo alguma influência, enquanto as amostras de inflorescências e raízes foram agrupadas, principalmente, de acordo com a disponibilidade de certos nutrientes no solo, especialmente os macronutrientes Ca, Mg, P e K, e os micronutrientes Fe e Cu. Para as amostras de inflorescências, observou-se também que os níveis de radiação solar e temperatura parecem afetar significativamente o perfil metabólico desta parte do vegetal.

Vários fatores climáticos, como a disponibilidade de água, a temperatura e os níveis de radiação solar, são bem descritos como capazes de exercer influência na produção de metabólitos em plantas (ARBONA et al., 2013; RAMAKRISHNA; RAVISHANKAR,

2011; SHULAEV et al., 2008). Assim, plantas sob condições de escassez hídrica, estresse térmico ou variação nos níveis de radiação solar podem apresentar alterações na produção de certas classes de metabólitos.

Ambos os locais de cultivo dos espécimes de *T. diversifolia* utilizados neste estudo estão localizados na área do Cerrado brasileiro, no qual predomina o clima tropical semi-úmido. O clima do Cerrado brasileiro é caracterizado por uma forte sazonalidade das chuvas, com duas estações distintas: a estação seca que geralmente se estende de maio a setembro e uma estação chuvosa de outubro a abril, com uma temperatura média anual que varia entre 21,3° a 27,2°C (EMBRAPA, 2012). A disponibilidade de água é um fator conhecidamente relacionado com a variação na produção de metabolitos em plantas (ARBONA et al., 2013; GOBBO-NETO; LOPES, 2007; RAMAKRISHNA; RAVISHANKAR, 2011). As amostras usadas neste estudo foram cultivadas em locais que possuem uma distribuição desigual de precipitação ao longo do ano, então, ao se analisar os *scores plots* da análise por PCA, é possível determinar uma relação entre a sazonalidade da chuva na área com o perfil metabólico das folhas e caules (Figuras 19 e 23).

Pode-se observar que as amostras coletadas durante os períodos mais chuvosos tendem a se agrupar, sendo estas amostras ricas, primordialmente, em metabólitos primários, tais como açúcares, nucleosídeos e derivados de ácidos graxos. Já as amostras de folhas e caules coletadas durante os períodos mais secos apresentam-se ricas em metabólitos secundários, tais como lactonas sesquiterpênicas, particularmente nos meses mais frios, enquanto que nos meses mais quentes houve um acúmulo de ésteres de derivados do ácido *trans*-cinâmico. Durante o período de transição entre as estações seca e chuvosa, as amostras de folhas e caules apresentaram níveis intermediários de ambos os tipos de metabólitos, primários e secundários.

De acordo com os resultados das análises de PCA, as amostras de raízes e inflorescências de *T. diversifolia* foram agrupadas em um padrão mais relacionado à disponibilidade de certos nutrientes do solo, como pode ser observado nas Figuras 27 e 31.

As amostras de raízes foram distribuídas em três grandes grupos, sendo o primeiro grupo (GR1) composto majoritariamente de amostras do estado de Goiás coletadas principalmente no primeiro ano de estudo e de amostras do estado de São Paulo coletadas no primeiro semestre do primeiro ano de estudo. Durante este período de coletas observou-se níveis mais elevados de macronutrientes no solo de ambas as regiões e o grupo GR1 foi caracterizado por um menor acúmulo de metabolitos secundários. O segundo grupo, GR2, é composto de um número maior de amostras de Goiás coletadas principalmente no segundo

ano do estudo, e de as amostras de São Paulo coletadas na segunda metade do primeiro ano, de forma que os níveis observados de macronutrientes do solo diminuíram durante este período e em paralelo, as amostras do grupo GR2 apresentaram um pequeno, mas significativo acúmulo de substâncias fenólicas. O terceiro grupo, GR3, é composto principalmente de amostras de São Paulo coletadas durante o segundo ano de estudo, sendo que este período de coleta apresentou os menores níveis de macronutrientes do solo, com um aumento na acumulação de substâncias fenólicas, em especial os ésteres de derivados do ácido *trans*-cinâmico, para as amostras deste grupo.

Para as inflorescências, observou-se a existência de dois grupos principais (Figura 31). Grupo GI1 é composto principalmente de amostras de Goiás, sendo que este local de cultivo apresentou um solo rico em Ca e Cu, e um clima com menores temperaturas e menores níveis de radiação solar durante o período de floração. Este grupo apresentou uma correlação entre o aumento dos níveis de Ca no solo e o acúmulo de açúcares nesta parte do vegetal, enquanto o acúmulo de lactonas sesquiterpênicas nas inflorescências parece estar correlacionado com o aumento dos níveis de Cu no solo. Grupo GI2 consiste, principalmente, de amostras coletadas em São Paulo, com temperaturas mais elevadas e maiores níveis de radiação solar. As amostras de inflorescências deste grupo se caracterizam pela acumulação de ésteres de derivados de ácido *trans*-cinâmico. Assim como as amostras provenientes de Goiás, a presença de certos nutrientes do solo pode estar associada com a ocorrência de alguns dos metabolitos. Um pequeno acúmulo de metabolitos primários ou lactonas sesquiterpênicas foi observado em amostras deste grupo, de acordo com os níveis de Ca (metabólitos primários) e Cu (LST) no solo.

As quatro amostras *outlier* para as partes aéreas (uma para as folhas, duas para os caules e outra para as inflorescências) foram caracterizadas por elevada acumulação de duas lactonas sesquiterpênicas específicas: tagitinina A e, principalmente, tagitinina C. Todas estas amostras *outliers* foram coletadas em São Paulo durante a estação seca do primeiro ano de estudo. O aumento observado na produção e acúmulo das tagitininas A e C nessas amostras pode estar relacionado a uma combinação específica de condições ambientais, neste caso, a baixa disponibilidade de água, baixas temperaturas e baixos níveis de radiação solar.

Os *loading plots* da análise por PCA dos dados obtidos a partir da análise de RMN (*J-resolved*) apresentam sinais com valores de deslocamento químico que representam as principais classes dos metabolitos utilizados como discriminantes para os respectivos grupos propostos. Por exemplo, como mostrado nas Figuras 20B e 24B, os sinais entre 5 a 6 ppm estão relacionados com as ligações duplas olefínicas presentes em esqueletos carbônicos

alifáticos, e os sinais entre 2 a 3 ppm correspondem aos hidrogênios ligados a átomos de carbono saturado próximos a um grupo carbonila, de forma que tais sinais são típicos aos ácidos graxos insaturados e lactonas sesquiterpênicas como a tagitinina C, encontrados em amostras de folhas e caules agrupadas nos grupos GF1 e GC1, os quais são caracterizados pelo acúmulo dessas substâncias.

A caracterização dos grupos ricos em ésteres de derivados do ácido *trans*-cinâmico não foi tão clara utilizando apenas os dados obtidos por RMN (*J-resolved*), devido, principalmente, a sobreposição de sinais de hidrogênio de substâncias pertencentes a diferentes classes de metabolitos, tais como os sinais de entre 6 e 7 ppm para os hidrogênios fenólicos que se sobrepõem com os sinais dos hidrogênios de ligações duplas conjugadas presentes em alguns tipos de lactonas sesquiterpênicas. A utilização dos dados obtidos por UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS foi muito útil para discriminar ambos os grupos. Por outro lado, os dados de RMN (*J-resolved*) foram muito úteis na caracterização dos grupos de amostras ricas em açúcares, caracterizados por sinais de hidrogênio entre 3 e 5 ppm, típicos de hidrogênios metínicos hidroxilados comuns em moléculas de carboidratos. Os gráficos da análise do tipo *S-line* obtidos pelo método de OPLS-DA realizado a partir dos dados de RMN (*J-resolved*), apresentados nos APÊNDICES AA até DD, ilustram como alguns sinais de RMN ^1H de diferentes classes de metabolitos podem ser úteis para separação de dois grupos distintos de amostras dentro de uma mesma espécie, como bons discriminantes entre diferentes perfis químicos.

O mecanismo envolvido na influência dos fatores climáticos sobre o metabolismo de *T. diversifolia* parece estar relacionado com a indução sazonal de fatores de estresse na planta, tais como: (i) o estresse hídrico, o que pode causar uma redução da taxa fotossintética com um consequente aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), portanto, resultando em um aumento na produção de substâncias fenólicas (antioxidantes naturais) durante a estação seca como um mecanismo de defesa (ARBONA et al., 2013; GOBBONETO; LOPES, 2007; RAMAKRISHNA; RAVISHANKAR, 2011; REDDY; CHAITANYA; VIVEKANANDAN, 2004); (ii) estresse térmico causado pela ampla variação de temperatura durante o ano, especialmente nos períodos mais secos, o que pode afetar a regulação metabólica, a permeabilidade à água e ao CO_2 , e a taxa de reações intracelulares (MORISON; LAWLOR, 1999; RAMAKRISHNA; RAVISHANKAR, 2011), bem como pode estimular os sistemas antioxidantes, devido à maior disponibilidade de carboidratos (MORISON; LAWLOR, 1999); e (iii) o estresse pela radiação solar, especialmente radiação UV-B (280-320 nm), que afeta principalmente a produção de substâncias fenólicas (taninos, antocianinas,

flavonoides e outros derivados do ácido *trans*-cinâmico), que, além de contribuir para a absorção e/ou dissipação de energia solar, fornecem proteção contra os efeitos nocivos da radiação UV, tais como o dano tecidual induzido diretamente por UV-B ou a formação de radicais livres e outras espécies oxidativas (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; GRACE; LOGAN, 2000).

A influência que os nutrientes do solo Ca, Mg, P, K e Cu exercem sobre as raízes e inflorescências de *T. diversifolia* pode estar relacionada com várias funções fisiológicas que tais nutrientes desempenham em plantas superiores, uma vez que estes nutrientes são essenciais para o crescimento e funcionamento normal do metabolismo (MARSCHNER, 1995). A acumulação de ésteres de derivados de ácido *trans*-cinâmico em raízes de solos com níveis mais baixos de macronutrientes pode ser uma resposta para a reduzida disponibilidade destes nutrientes, uma vez que polifenóis ligados a sesquióxidos têm a capacidade de prevenir a adsorção de fosfato. Além disso, os ácidos fenólicos também têm a capacidade de dessorver o fosfato ligado, aumentando assim a disponibilidade de P inorgânico no solo, além do fato de que os compostos fenólicos também podem reter cátions trocáveis inorgânicos (Ca, Mg e K) por proporcionarem sítios de sorção ácidos nos solos (HÄTTENSCHWILER; VITOUSEK, 2000).

A etapa de desreplicação possibilitou a identificação de 26 substâncias nos diferentes extratos de *T. diversifolia*, sendo que muitas destas substâncias já são descritas para esta espécie, como por exemplo, as LST tagitinina A e tagitinina C, ou os flavonoides nepetina, hispidulina e luteolina, contudo, também foi possível identificar substâncias que ainda não haviam sido descritas para esta espécie.

Dentre as substâncias identificadas pela primeira vez em *T. diversifolia*, excetuando-se aquelas isoladas dos extratos de *T. diversifolia*, como os derivados cafeoilquínicos (ácidos 5-*O*-cafeoilquínico, 3,4-*O*-dicafeoilquínico e 4,5-*O*-dicafeoilquínico) e o derivado cafeico ácido 4-*O*-cafeoil-2-*C*-metil-D-treônico, foi possível identificar nesta etapa, utilizando os dados obtidos por UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS, os flavonoides rutina, quercetina, quercetrina, isoquercetrina e apigenina, para os extratos das inflorescências, diferentes derivados nitrogenados do ácido cafeico, como a substância *spermine-N1,N5,N10,N14-Tetrakis(4-hydroxy-E-cinnamoyl)*, além de substâncias descritas como marcadores de estresse oxidativo em plantas, como o *phytoprostane F1 type I* (IMBUSCH; MUELLER, 2000).

Das novas substâncias identificadas em *T. diversifolia*, quase todas são polares, sendo que a maior parte delas pertence a classe dos flavonoides e foram detectadas

principalmente em amostras de folhas, contudo, algumas substâncias foram detectadas apenas em outras partes do vegetal, como os flavonoides quercetina e rutina, presentes apenas em amostras de inflorescências. A presença de algumas substâncias em apenas determinadas partes do vegetal, aliada aos resultados da análise quimiométrica das amostras, fortalece a hipótese de que o metabolismo secundário em *T. diversifolia* é distinto de acordo com cada parte da planta.

O estudo da variação regional do perfil metabólico de *T. diversifolia* por UHPLC-DAD-(ESI)-HRMS permitiu observar a existência de diferenças entre os espécimes coletados nas diferentes regiões do país, sendo que, após a comparação dos perfis metabólicos de todos os extratos analisados, propõem-se três grupos: o Grupo 1 (G1), concentrando a maioria das amostras oriundas dos estados de São Paulo e Goiás (com exceção dos extratos de folhas), amostras de caules, raízes e inflorescências coletadas no ano de 2013 nos estados do Pará e Santa Catarina e também de caules e raízes coletadas no estado do Rio Grande do Norte, sendo caracterizado pelo acúmulo de metabólitos primários, como açúcares e ácidos graxos, e metabólitos fenólicos, como os ácidos clorogênicos; o Grupo 2 (G2) é formado por amostras de folhas coletadas nos estados de São Paulo e Goiás e também em Santa Catarina em 2013, e é caracterizado pelo acúmulo de substâncias fenólicas (ACG) e lactonas sesquiterpênicas; e o Grupo 3 (G3), formado principalmente pelas amostras de caules, raízes e inflorescências coletadas no estado de Santa Catarina em 2012, e amostras de folhas, caules, raízes e inflorescências coletadas no estado do Pará em 2012 e também no Distrito Federal, sendo este grupo caracterizado pelo acúmulo de metabólitos primários nas amostras de caules e raízes e de LST nas amostras de folhas e inflorescências

Os agrupamentos propostos pela análise de HCA e PCA demonstram a existência de uma variação geográfica e sazonal para as amostras de alguns espécimes, como no caso dos extratos oriundos dos estados do Pará e Santa Catarina, uma vez que as amostras coletadas no ano de 2012 se agrupam, em sua maioria, no Grupo 3 e as coletadas em 2013 no Grupo 1. Já as amostras de caules, raízes e inflorescências coletadas nos estados de Goiás e São Paulo se inserem em um mesmo grupo (G1) e as de folhas também (G2), independente do ano de coleta. Para as amostras do RN e DF, foi possível realizar apenas a coleta do material no ano de 2012, o que não possibilitou a comparação entre dois anos distintos.

Uma análise dos resultados obtidos neste estudo de variação regional demonstra que não há um padrão geográfico claro para os espécimes de *T. diversifolia* dentro de território nacional dependente das diferentes zonas climáticas pelas quais se estende este território, uma vez que amostra de zonas climáticas bem distintas, como as provenientes dos

estados do Pará e de Santa Catarina se agruparam, enquanto amostras de uma mesma zona climática, como as provenientes de Goiás e do Distrito Federal, não. Como a maioria das amostras foi coletada sempre no mesmo período do ano (na época de floração), pode-se inferir que o efeito do clima possa ter sido mais homogêneo sobre todos os espécimes, de forma que outros fatores como os níveis de nutrientes do solo e fatores ambientais bióticos, possam ter sido os responsáveis pela variação observada no perfil metabólico das diferentes amostras coletadas.

Os resultados obtidos pelos ensaios de atividade antioxidante *in vitro* pelo método do DPPH demonstraram a existência de diferenças entre as partes do vegetal para esta atividade, mesmo com todos os extratos selecionados para este ensaio pertencendo a agrupamentos caracterizados pelo acúmulo de substâncias fenólicas.

A ação antioxidante avaliada pelo método do DPPH é baseada na presença de substâncias no meio reacional capazes de sequestrar o radical livre DPPH (Ex.: substâncias fenólicas como flavonoides e outros derivados cinâmicos), ocasionando assim a diminuição da absorbância em 515 nm (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995), o que indica a capacidade dessas substâncias em neutralizar a ação de radicais livres (ação antirradicalar). Desta forma, os resultados obtidos nesta etapa do estudo indicam que as amostras que apresentaram os menores valores de CE_{50} , no caso os extratos FG1213 e RS913, possuem uma maior proporção de substâncias com ação antirradicalar, em comparação com os demais extratos testados, e consequentemente as demais amostras de seus grupos também, uma vez que a proposta de agrupamento foi baseada na correlação do perfil químico dos extratos.

Os ensaios de determinação da atividade antioxidante sobre a enzima xantina oxidase (XOD) por quimiluminescência com oxidação do luminol e da atividade inibidora da peroxidação lipídica *in vitro* foram realizados a fim de se comparar o principal mecanismo envolvido na atividade antioxidante apresentada pelos extratos FG1213 e RS913, uma vez que o ensaio de quimiluminescência é baseado, assim como o DPPH, na capacidade das substâncias presentes no meio reacional em sequestrar o radical superóxido (O_2^{2-}) formado pela ação da enzima XOD sobre o substrato xantina, impedindo a reação desse radical com o luminol (GIROTTI et al., 2000; SANTOS; SANTOS, 1992). Já o ensaio de peroxidação lipídica *in vitro* baseia-se na capacidade das amostras em proteger um substrato lipídico (neste caso, a gema de ovo) da ação do radical livre hidroxila ($OH^\bullet$) formado pela Reação de Fenton entre o íon Fe^{2+} e uma molécula com um grupamento peróxido (Ex.: H_2O_2) (AUST; MOREHOUSE; THOMAS, 1985; HALLIWELL; CHIRICO, 1993; MINOTTI; AUST, 1989;

WINTERBOURN, 1995), a fim de se simular o processo de oxidação de membranas lipídicas celulares (COSTA et al., 2012; GUIMARÃES et al., 2010; SILVA et al., 2007).

Os resultados obtidos demonstram que o principal mecanismo envolvido na atividade antioxidante dos extratos testados é através do mecanismo de sequestro de radicais livres, baseado na diferença dos valores de CE_{50} obtidos ao final de todos os ensaios, sendo que os valores mais baixos foram obtidos para os métodos do DPPH e quimiluminescência (Tabela 17) e os maiores para o ensaio de peroxidação lipídica (Tabela 17). Uma vez que os extratos foram escolhidos a partir de grupos de amostras ricas em substâncias fenólicas, as quais já são descritas como sequestrantes de radicais livres por diferentes métodos (HERNÁNDEZ et al., 2009; KRISHNAIAH; SARBATLY; NITHYANANDAM, 2011; RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996; SARTOR et al., 2013; UPADHYAY; MOHAN RAO, 2013), os resultados obtidos condizem com o esperado de acordo com a literatura disponível sobre a atividade antioxidante de extratos ricos em substâncias fenólicas.

Os valores de CE_{50} mais altos observados para os dois extratos testados no ensaio de inibição da peroxidação lipídica podem ser explicados pelo fato de que os principais componentes com propriedades antioxidantes são as substâncias fenólicas, as quais apresentam características mais polares, desta forma, como o substrato apresentava-se mais apolar, devido a grande proporção de lipídeos na gema de ovo, pode ter ocorrido que as substâncias fenólicas não tenham conseguido se misturar completamente ao substrato no meio pela diferença de polaridade e desta forma, sendo incapazes de sequestrar os radicais livres formados pela reação com o Fe^{2+} .

O ensaio para avaliação da toxicidade celular pelo método de incorporação do vermelho neutro foi realizado com os dois extratos selecionados a fim de determinar quais as concentrações de trabalho que seriam utilizadas nos teste posteriores. O extrato RS913 não apresentou toxicidade em nenhuma das concentrações testadas para ambas as linhagens celulares (fibroblastos L929 e queratinócitos HaCaT) até o máximo de 400,0 $\mu\text{g/mL}$, o que pode ser explicado pela ausência de LST neste extrato, uma vez que é reportado na literatura a relação entre a toxicidade celular de extratos de *T. diversifolia* com a presença dessa classe de substâncias (CHAGAS-PAULA et al., 2012; GU et al., 2002; KURODA et al., 2007; LEE et al., 1971; LIAO et al., 2013; RODRIGUEZ; TOWERS; MITCHELL, 1976). Já para o extrato FG1213 foi possível determinar os valores de CI_{50} para ambas as linhagens celulares e a partir deste valores estabeleceu-se as concentrações máximas de trabalho para os demais ensaios em cultura de células.

Analisando os resultados dos ensaios de toxicidade celular em cultura de fibroblastos L929 e queratinócitos HaCaT, observamos que a presença de LST no extrato FG1213 parece ser o fator primordial para o nível de toxicidade celular do mesmo, uma vez que este extrato apresentou-se mais tóxico para as linhagens celulares utilizadas nos ensaios do que o extrato RS913, sendo que a principal diferença na constituição química entre estes dois extratos, baseando-se nos dados obtidos após a etapa de desreplicação, é a presença de LST nas folhas e a ausência nas raízes.

Lactonas sesquiterpênicas como a Tagitinina C são conhecidamente citotóxicas, sendo inclusive estudadas quanto a suas propriedades antitumorais, uma vez que apresentam toxicidade celular para diferentes linhagens de células (AMORIM et al., 2013; KURODA et al., 2007; LEE et al., 1971; LIAO et al., 2013; RODRIGUEZ; TOWERS; MITCHELL, 1976), dessa forma, os resultados obtidos para o ensaio de toxicidade celular nas linhagens celulares estudadas são consistentes com as informações disponíveis na literatura, sendo que os extratos ricos em LST apresentam maior potencial de inibição da viabilidade celular (menor valores de CI_{50}) do que um extrato que não possui estas substâncias ou no qual elas sejam pouco abundantes.

Os resultados obtidos após a realização dos ensaios para eficácia da atividade fotoprotetora dos extratos em cultura de células irradiadas com radiação UV-A e UV-B demonstraram que ambos os extratos apresentam atividade fotoprotetora para as linhagens testadas para a radiação UV-A, considerando que tanto os fibroblastos L929 quanto os queratinócitos HaCaT irradiados com radiação UV-A sob as placas de quartzo contendo as formulações dos extratos FG1213 e RS913 (separadamente) apresentaram menor formação de EROs em comparação com o controle irradiado, o que indica que os componentes do extrato foram capazes de absorver parte da radiação, impedindo a formação de EROs intracelular. Já em relação a atividade fotoprotetora para a radiação UV-B, ambos os extratos demonstraram atividade no ensaio realizado com a linhagem de queratinócitos HaCaT, uma vez que a viabilidade das células irradiadas com radiação UV-B sob as placas de quartzo contendo as formulações dos extratos foi maior do que a obtida para o controle irradiado, contudo, para a linhagem de fibroblasto L929 não houve diferença estatisticamente significativa entre a viabilidade celular dos extratos e do controle irradiado.

Os resultados dos ensaios de fotoproteção indicam que os extratos selecionados apresentam certa eficácia fotoprotetora para as linhagens celulares testadas, principalmente para a linhagem de queratinócitos HaCaT, o que indica que as substâncias presentes nestes extratos, principalmente as fenólicas, conseguem absorver a radiação UV, protegendo às

células do dano associado a exposição a este tipo de radiação. Estes resultados corroboram o critério de escolha de extratos pertencentes aos grupos de amostras ricas em substâncias fenólicas para a realização dos ensaios *in vitro*, uma vez que a literatura reporta a capacidade dessas substâncias de absorver a radiação em diferentes faixas do espectro luminoso, principalmente na região do UV-A e UV-B (JANSEN et al., 2001; SCHREINER et al., 2012; TREUTTER, 2005, 2006).

A avaliação da fototoxicidade dos extratos indicou que o extrato das raízes RS913 não apresentou toxicidade para nenhuma das duas linhagens celulares testadas, após exposição à radiação UV-B, a qual possui maior poder ionizante e capacidade de catalisar reações químicas. Apesar de não apresentar fototoxicidade nas concentrações testadas, o extrato RS913 não foi capaz de aumentar a viabilidade celular para nenhuma das linhagens celulares após a exposição a radiação, uma vez que não houve diferença estatisticamente significativa entre as células tratadas com o extrato e o controle irradiado.

O extrato de folhas FG1213 apresentou resultados diferentes para as duas linhagens celulares utilizadas no ensaio de avaliação da fototoxicidade, sendo que para a linhagem de fibroblastos L929 este extrato apresentou toxicidade na maior concentração testada (30,0 µg/mL), na qual a viabilidade celular observada foi menor quando comparada com o controle irradiado, com um valor de $p < 0,05$ obtido pelo teste de Turkey. As outras concentrações do extrato FG1213 testadas não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao controle irradiado, o que indica que nestas concentrações este extrato não apresenta toxicidade para a linhagem L929 após exposição à radiação UV-B na dose de 0,6 J/cm².

Considerando os resultados obtidos no ensaio de fototoxicidade para o extrato FG1213 realizado em cultura de queratinócitos HaCaT, pode-se observar que o extrato não apresentou fototoxicidade em nenhuma das concentrações testadas após a exposição a radiação UV-B, e que nas concentrações maiores, de 12,0 até 20,0 µg/mL, a presença do extrato aumentou a viabilidade celular observada em comparação com o controle irradiado, sendo que para a concentração de 20,0 µg/mL não houve diferença estatisticamente significativa para a viabilidade celular em comparação com o controle não irradiado.

Os resultados dos ensaios de fototoxicidade indicam que o extrato FG1213 apresenta algum tipo de atividade fotoquimiopreventiva para a linhagem de queratinócitos HaCaT, uma vez que na presença desse extrato, na concentração de 20 µg/mL, observa-se um número significativamente maior de células viáveis na placa quando comparado ao controle irradiado, ou seja, os componentes do extrato em contato com as células foram capaz de

protege-las do dano provocado pela radiação UV-B e consequentemente, aumentar a viabilidade celular em condições de estresse fototóxico.

O ensaio para avaliação *in vitro* da eficácia fotoquimiopreventiva dos extratos pela geração de peróxidos lipídicos em cultura de células demonstrou que apenas o extrato FG1213 foi ativo para a linhagem de queratinócitos HaCaT, reduzindo significativamente a quantidade de MDA (indicador de peroxidação em membranas lipídicas) formado no interior das células após exposição a radiação UV-B na dose de 7,5 J/cm². O extrato de RS913 não demonstrou capacidade de inibir a peroxidação lipídica no interior da células HaCaT expostas a radiação UV-B na concentração testada, e nenhum dos dois extratos testados apresentou atividade neste ensaio para a linhagem de fibroblastos L929.

A atividade fotoquimiopreventiva demonstrada pelo extrato de folhas de *T. diversifolia* FG1213 em cultura de queratinócitos HaCaT, seja pelo aumento da viabilidade celular ou pela inibição da peroxidação lipídica após exposição a radiação UV-B, pode estar relacionada a presença significativa de flavonoides neste extrato, e isso explicaria o porque do extrato de raízes RS913 não ter apresentado atividade em nenhum dos ensaios realizados, pois, apesar de ter sido obtido de uma amostra rica em substâncias fenólicas, os resultados da etapa de desreplicação indicam que para as raízes, a maioria dos fenóis presentes em sua composição são ácidos cafeoilquínicos e outros derivados do ácido cafeico, com pequena proporção de flavonoides, enquanto para as folhas, a proporção de flavonoides dentre as substâncias fenólicas é significativamente maior.

Flavonoides e outras substâncias estruturalmente semelhantes são descritas na literatura por apresentarem atividade fotoquimiopreventiva em cultura de células da pele, tanto em ensaios com substâncias isoladas como em ensaios com extratos vegetais ricos em tais componentes. O estudo realizado por Afaq et al. (2007) descreve a atividade fotoquimiopreventiva *in vitro* da antocianidina delphinidina em cultura de queratinócitos HaCaT, no qual pôde-se observar tanto um aumento da viabilidade celular quanto a diminuição da peroxidação lipídica nas células após a exposição à radiação UV-B. Vários trabalhos disponíveis na literatura descrevem a ação fotoquimiopreventiva de extratos vegetais ricos em flavonoides, como apigenina, rutina, quercetina, luteolina, genisteína, silibinina (principal componente ativo da silimarina), entre outros, sendo que os mecanismos associados a tal atividade estão relacionados a capacidade dessas substâncias atuarem como antioxidantes e anti-inflamatórios, o que leva a inibição na formação de EROs e da peroxidação lipídica de membranas celulares induzida por radiação UV-A e UV-B, diminuição da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e enzimas catalase,

redução nos níveis intracelulares de MDA, e diminuição do dano oxidativo pela modulação de ativação da transcrição do fator NF- κ B e de apoptose induzidos por radiação UV-B (AFAQ; MUKHTAR, 2002; ALLEMANN; BAUMANN, 2009; F'GUYER; AFAQ; MUKHTAR, 2003; NICHOLS; KATIYAR, 2010).

Considerando todos os resultados apresentados, podemos destacar as relações entre o ambiente e o perfil metabólico de *T. diversifolia*, em que a variação na produção de certas classes de metabolitos na planta parece ser uma resposta direta às mudanças nas condições de seu ambiente circundante. Pode-se destacar ainda que o conjunto de técnicas analíticas selecionadas para este trabalho, combinadas à análise estatística multivariada adequada, nos permitiu obter dados estatisticamente confiáveis que contribuem para uma compreensão holística do papel do metabolismo primário e, principalmente, do secundário, na adaptação de uma espécie vegetal aos diferentes fatores ambientais do local onde ela se desenvolve e como cada parte da planta é diferentemente afetada pelo ambiente circundante.

Outro ponto de destaque é a utilização da abordagem metabolômica ambiental para a seleção de extratos com maior potencial frente a uma dada atividade biológica desejada, como a fotoproteção e fotoquimiprevenção, baseando-se na capacidade de se analisar várias amostras rapidamente e se obter perfis metabólicos confiáveis pelas técnicas analíticas utilizadas, e de se estabelecer a relação dos fatores ambientais com a variação do perfil metabólico das diferentes amostras pela análise multivariada, a fim de, considerando a informação obtida, selecionar os extratos com perfis químicos mais promissores para a atividade alvo, sem a necessidade de se realizar ensaios *in vitro* de triagem com grande número de amostras, e também ter disponível para os extratos mais promissores as informações sobre as melhores condições de cultivo e coleta para se obter tais extratos, ou seja, a utilização de um modelo baseado na relação ambiente-metabolismo-atividade biológica.

6 CONCLUSÕES

Ao final deste trabalho podemos concluir os seguintes pontos:

- Os principais constituintes polares dos extratos de *T. diversifolia* pertencem à classe dos metabólitos fenólicos, em especial os derivados do ácido *trans*-cinâmico como os ACG e os flavonoides;
- As LST são os constituintes majoritários dos extratos das folhas e inflorescências, estando também presentes nos extratos dos caules e ausentes nos extratos das raízes;
- Apesar de amplamente estudada do ponto de vista fitoquímico, a espécie *T. diversifolia* ainda apresenta constituintes químicos não descritos, como o ácido 4-*O*-cafeoil-2-*C*-metil-D-treônico, o que reforça o potencial da espécie como fonte de novas entidades químicas de interesse;
- A produção e acúmulo de metabólitos primários e secundários em *T. diversifolia* frente às variações do ambiente são diferentes para cada parte do vegetal: folhas, caules, raízes e inflorescências;
- O comportamento sazonal dos metabólitos encontrados nas folhas e caules de *T. diversifolia* é fortemente influenciado por fatores climáticos como precipitação, umidade do ar, temperatura e radiação solar;
- O metabolismo das raízes parece estar altamente relacionado aos níveis de macro e micronutrientes do solo;
- A produção e acúmulo de metabólitos nas inflorescências estão relacionados tanto com fatores climáticos, como temperatura e radiação solar, quanto com os nutrientes do solo, principalmente Ca e Cu;
- Em relação aos constituintes voláteis presentes nos óleos essenciais das folhas e inflorescências de *T. diversifolia*, o local de coleta parece ser o principal fator de variação, com os nutrientes do solo exercendo influência sobre a produção dos óleos essenciais;
- A diferença quanti e qualitativa para os constituintes do óleos essenciais das folhas e inflorescências, de acordo com a região de origem do espécime coletado, pode indicar a existência de quimiotipos diferentes para a espécie em relação à produção de óleos essenciais;

- Os perfis metabólicos obtidos de espécimes de *T. diversifolia* coletados em diferentes regiões do Brasil indicaram que a diferença observada para a composição química dos extratos, quando obtidos de amostras coletadas em uma mesma época do ano, não está diretamente relacionada ao tipo de clima do local de coleta, podendo estar mais ligada ao tipo de solo;
- A análise multivariada dos dados obtidos pelo estudo metabolômico permitiram a seleção dos extratos com melhor potencial para os ensaios de atividade antioxidante *in vitro*;
- Os extratos de folhas e raízes apresentaram maior atividade sequestrante de radicais livres do que os extratos de caules e inflorescências;
- A presença de LST no extrato de folhas FG1213 e a ausência no extrato de raízes RS913 é o fator principal para explicar a diferença entre os níveis de toxicidade celular dos dois extratos, com o extrato FG1213 sendo o mais citotóxico;
- Ambos os extratos apresentaram potencial fotoprotetor UV-A e UV-B em ensaio de cultura de células irradiadas;
- O extrato de folhas de *T. diversifolia* FG1213 apresentou potencial fotoquimiopreventivo para a linhagem de queratinócitos HaCaT após exposição a radiação UV-B, pelo aumento da viabilidade celular e inibição da peroxidação lipídica nas células;
- A abordagem metabolômica ambiental demonstra potencial para a elaboração de modelos de seleção racionais de extratos naturais com propriedades biológicas de interesse baseado na relação ambiente-metabolismo-atividade.

7 REFERÊNCIAS

- ABE, A. E.; DE OLIVEIRA, C. E.; DALBONI, T. M.; CHAGAS-PAULA, D. A.; ROCHA, B. A.; DE OLIVEIRA, R. B.; GASPAROTO, T. H.; DA COSTA, F. B.; CAMPANELLI, A. P. Anti-inflammatory sesquiterpene lactones from *Tithonia diversifolia* trigger different effects on human neutrophils. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 2, p. 111–116, 2015.
- AFAQ, F.; MUKHTAR, H. Photochemoprevention by Botanical Antioxidants. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 15, n. 5, p. 297–306, 2002.
- AFAQ, F.; SYED, D. N.; MALIK, A.; HADI, N.; SARFARAZ, S.; KWEON, M.-H.; KHAN, N.; ZAID, M. A.; MUKHTAR, H. Delphinidin, an Anthocyanidin in Pigmented Fruits and Vegetables, Protects Human HaCaT Keratinocytes and Mouse Skin Against UVB-Mediated Oxidative Stress and Apoptosis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 1, p. 222–232, jan. 2007.
- AGATI, G.; TATTINI, M. Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection. **New Phytologist**, v. 186, n. 4, p. 786–793, 2010.
- AGRAWAL, S. S.; TALELE, G. S. Bioactivity guided isolation and characterization of the phytoconstituents from the *Tridax procumbens*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 1, p. 58–62, fev. 2011.
- ALLEMANN, I.; BAUMANN, L. Botanicals in skin care products. **International Journal of Dermatology**, v. 48, n. 9, p. 923–934, 2009.
- ALVARENGA, S. A. .; FERREIRA, M. J. .; EMERENCIANO, V. .; CABROL-BASS, D. Chemosystematic studies of natural compounds isolated from Asteraceae: characterization of tribes by principal component analysis. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 56, n. 1, p. 27–37, abr. 2001.
- AMBRÓSIO, S. R.; OKI, Y.; HELENO, V. C. G.; CHAVES, J. S.; NASCIMENTO, P. G. B. D.; LICHSTON, J. E.; CONSTANTINO, M. G.; VARANDA, E. M.; DA COSTA, F. B. Constituents of glandular trichomes of *Tithonia diversifolia*: relationships to herbivory and antifeedant activity. **Phytochemistry**, v. 69, n. 10, p. 2052–2060, jul. 2008.
- AMORIM, M. H. R.; GIL DA COSTA, R. M.; LOPES, C.; BASTOS, M. M. S. M. Sesquiterpene lactones: Adverse health effects and toxicity mechanisms. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 43, n. 7, p. 559–579, ago. 2013.
- ARBONA, V.; MANZI, M.; OLLAS, C. DE; GÓMEZ-CADENAS, A. Metabolomics as a tool to investigate abiotic stress tolerance in plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 3, p. 4885–4911, jan. 2013.
- AUST, S. D.; MOREHOUSE, L. A.; THOMAS, C. E. Role of metals in oxygen radical reactions. **Journal of Free Radicals in Biology & Medicine**, v. 1, n. 1, p. 3–25, jan. 1985.

BELINATI, K. D. **Efeitos do ácido clorogênico sobre funções de neutrófilos: estudos in vitro**. 2010. 62 f. Dissertação (Mestrado em Toxicologia e Análises Toxicológicas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. São Paulo.

BORENFREUND, E.; PUERNER, J. A. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). **Journal of Tissue Culture Methods**, v. 9, n. 1, p. 7–9, 1985.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248–254, maio 1976.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, jan. 1995.

BUNDY, J. G.; DAVEY, M. P.; VIAN, M. R. Environmental metabolomics: a critical review and future perspectives. **Metabolomics**, v. 5, n. 1, p. 3–21, 28 dez. 2009.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Eds.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª edição. Florianópolis-SC: Editora UFRGS/Editora UFSC, 2004. p. 519–535.

CASTAÑO-QUINTANA, K.; MONTROYA-LERMA, J.; GIRALDO-ECHEVERRI, C. Toxicity of foliage extracts of *Tithonia diversifolia* (Asteraceae) on *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Myrmicinae) workers. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 391–395, jan. 2013.

CHAGAS-PAULA, D. A.; OLIVEIRA, R. B.; ROCHA, B. A.; DA COSTA, F. B. Ethnobotany, chemistry, and biological activities of the genus *Tithonia* (Asteraceae). **Chemistry & biodiversity**, v. 9, n. 2, p. 210–235, fev. 2012.

CHAGAS-PAULA, D. A.; OLIVEIRA, R. B. DE; DA SILVA, V. C.; GOBBO-NETO, L.; GASPAROTO, T. H.; CAMPANELLI, A. P.; FACCIOLI, L. H.; DA COSTA, F. B. Chlorogenic acids from *Tithonia diversifolia* demonstrate better anti-inflammatory effect than indomethacin and its sesquiterpene lactones. **Journal of ethnopharmacology**, v. 136, n. 2, p. 355–362, 22 jun. 2011.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 7, p. 1033–1043, 15 maio 2000.

COSTA, D. A.; DE OLIVEIRA, G. A. L.; DE SOUSA, D. P.; DE FREITAS, R. M. Avaliação do potencial antioxidante in vitro do composto ciano-carvona. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 4, p. 567–575, 2012.

DE TOLEDO, J. S.; AMBRÓSIO, S. R.; BORGES, C. H. G.; MANFRIM, V.; CERRI, D. G.; CRUZ, A. K.; DA COSTA, F. B. In vitro leishmanicidal activities of sesquiterpene lactones

from *Tithonia diversifolia* against *Leishmania braziliensis* promastigotes and amastigotes. **Molecules**, v. 19, n. 5, p. 6070–6079, jan. 2014.

DOOL, H. VAN DEN; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 2, n. 3, p. 463–471, 1963.

EMBRAPA. **O Cerrado**. Disponível em: <<http://www.cpac.embrapa.br/unidade/ocerrado/>>. Acesso em: 13 jul. 2014.

F'GUYER, S.; AFAQ, F.; MUKHTAR, H. Photochemoprevention of skin cancer by botanical agents. **Photodermatology, photoimmunology & photomedicine**, v. 19, n. 2, p. 56–72, 2003.

FIGUEIREDO, S. A.; VILELA, F. M. P.; SILVA, C. A. DA; CUNHA, T. M.; DOS SANTOS, M. H.; FONSECA, M. J. V. In vitro and in vivo photoprotective/photochemopreventive potential of *Garcinia brasiliensis* epicarp extract. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 131, p. 65–73, 2014.

FONSECA, A. P. N. DE D.; SILVA, G. D. DE F.; CARVALHO, J. DE J.; SALAZAR, G. D. C. M.; DUARTE, L. P.; SILVA, R. P.; JORGE, R. M.; TAGLIATI, C. A.; ZANI, C. L.; ALVES, T. M. DE A.; PERES, V.; VIEIRA FILHO, S. A. Estudo fitoquímico do decocto das folhas de *Maytenus truncata* Reissek e avaliação das atividades antinociceptiva, antiedematogênica e antiulcerogênica de extratos do decocto. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 842–847, ago. 2007.

FORSHER, J.; IDBORG, H.; JACOBSSON, S. P. Evaluation of different techniques for data fusion of LC/MS and 1H-NMR. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 85, n. 1, p. 102–109, 2007.

GAMA, R. M. DA; GUIMARÃES, M.; ABREU, L. C. DE; ARMANDO-JUNIOR, J. Phytochemical screening and antioxidant activity of ethanol extract of *Tithonia diversifolia* (Hemsl) A. Gray dry flowers. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, n. 9, p. 740–742, 2014.

GIROTTI, S.; FINI, F.; FERRI, E.; BUDINI, R.; PIAZZI, S.; CANTAGALLI, D. Determination of superoxide dismutase in erythrocytes by a chemiluminescent assay. **Talanta**, v. 51, n. 4, p. 685–692, 2000.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374–381, 2007.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Online identification of chlorogenic acids, sesquiterpene lactones, and flavonoids in the Brazilian arnica *Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae) leaves by HPLC-DAD-MS and HPLC-DAD-MS/MS and a validated HPLC-DAD method for their simultaneous anal. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 4, p. 1193–1204, 2008.

GOFFIN, E.; ZIEMONS, E.; DE MOL, P.; DE MADUREIRA, M. D. C.; MARTINS, A. P.; PROENÇA DA CUNHA, A.; PHILIPPE, G.; TITS, M.; ANGENOT, L.; FREDERICH, M. In

vitro antiplasmodial activity of *Tithonia diversifolia* and identification of its main active constituent: Tagitinin C. **Planta Medica**, v. 68, n. 6, p. 543–545, 2002.

GRACE, S. C.; LOGAN, B. A. Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 355, n. 1402, p. 1499–510, 29 out. 2000.

GU, J.-Q.; GILLS, J. J.; PARK, E. J.; MATA-GREENWOOD, E.; HAWTHORNE, M. E.; AXELROD, F.; CHAVEZ, P. I.; FONG, H. H. S.; MEHTA, R. G.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, A. D. Sesquiterpenoids from *Tithonia diversifolia* with potential cancer chemopreventive activity. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 4, p. 532–536, abr. 2002.

GUIMARÃES, A. G.; OLIVEIRA, G. F.; MELO, M. S.; CAVALCANTI, S. C. H.; ANTONIOLLI, A. R.; BONJARDIM, L. R.; SILVA, F. A.; SANTOS, J. P. A.; ROCHA, R. F.; MOREIRA, J. C. F.; ARAÚJO, A. A. S.; GELAIN, D. P.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 107, n. 6, p. 949–957, 2010.

GUTZEIT, D.; WRAY, V.; WINTERHALTER, P.; JERZ, G. Preparative Isolation and Purification of Flavonoids and Protocatechuic Acid from Sea Buckthorn Juice Concentrate (*Hippophaë rhamnoides* L. ssp. *rhamnoides*) by High-Speed Counter-Current Chromatography. **Chromatographia**, v. 65, n. 1-2, p. 1–7, 2006.

HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 57, n. 5, p. 715S–725S, 1993.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 481–504, nov. 2000.

HÄTTENSCHWILER, S.; VITOUSEK, P. M. The role of polyphenols in terrestrial ecosystem nutrient cycling. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 15, n. 6, p. 238–242, 2000.

HERNÁNDEZ, I.; ALEGRE, L.; VAN BREUSEGEM, F.; MUNNÉ-BOSCH, S. How relevant are flavonoids as antioxidants in plants? **Trends in plant science**, v. 14, n. 3, p. 125–32, mar. 2009.

IMBUSCH, R.; MUELLER, M. J. Analysis of oxidative stress and wound-inducible dinor isoprostanes F(1) (phytoprostanes F(1)) in plants. **Plant Physiology**, v. 124, n. 3, p. 1293–1304, 2000.

JANSEN, M. A.; VAN DEN NOORT, R. E.; TAN, M. Y.; PRINSEN, E.; LAGRIMINI, L. M.; THORNELEY, R. N. Phenol-oxidizing peroxidases contribute to the protection of plants from ultraviolet radiation stress. **Plant Physiology**, v. 126, n. 3, p. 1012–1023, jul. 2001.

JUANG, C.-L.; YANG, F.; HSIEH, M.; TSENG, H.-Y.; CHEN, S.-C.; WEN, H.-C. Investigation of anti-oxidative stress in vitro and water apparent diffusion coefficient in MRI on rat after spinal cord injury in vivo with *Tithonia diversifolia* ethanolic extracts treatment. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 1, p. 447-454, 2014.

KIM, J. Y.; CHO, J. Y.; MA, Y. K.; PARK, K. Y.; LEE, S. H.; HAM, K. S.; LEE, H. J.; PARK, K. H.; MOON, J. H. Dicafeoylquinic acid derivatives and flavonoid glucosides from glasswort (*Salicornia herbacea* L.) and their antioxidative activity. **Food Chemistry**, v. 125, n. 1, p. 55–62, 2011.

KRISHNAIAH, D.; SARBATLY, R.; NITHYANANDAM, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, n. 3, p. 217–233, jul. 2011.

KURODA, M.; YOKOSUKA, A.; KOBAYASHI, R.; JITSUNO, M.; KANDO, H.; NOSAKA, K.; ISHII, H.; YAMORI, T.; MIMAKI, Y. Sesquiterpenoids and flavonoids from the aerial parts of *Tithonia diversifolia* and their cytotoxic activity. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 55, n. 8, p. 1240–1244, ago. 2007.

LAMATY, G.; MENUT, C.; ZOLLO, P.-H. A.; KUIATE, J. R.; BESSIÈRE, J.-M.; KOUDOU, J. Aromatic Plants of Tropical Central Africa. III. Constituents of the Essential Oil of the Leaves of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray from Cameroon. **Journal of Essential Oil Research**, v. 3, n. 6, p. 399–402, 1991.

LEE, K.-H.; HUANG, E.-S.; PIANTADOSI, C.; PAGANO, J. S.; GEISSMAN, T. A. Cytotoxicity of Sesquiterpene Lactones. **Cancer Research**, v. 31, p. 1649–1654, 1971.

LI, X.; HUANG, G.; ZHAO, G.; CHEN, W. Two New Monoterpenes from *Tithonia diversifolia* and Their Anti-Hyperglycemic Activity. **Records of Natural Products**, v. 4, p. 351–354, 2013.

LIAO, M.-H.; TSAI, Y.-N.; YANG, C.-Y.; JUANG, C.-L.; LEE, M.-Y.; CHANG, L.-H.; WEN, H.-C. Anti-human hepatoma Hep-G2 proliferative, apoptotic, and antimutagenic activity of tagitinin C from *Tithonia diversifolia* leaves. **Journal of Natural Medicines**, v. 67, n. 1, p. 98–106, jan. 2013.

LIASU, M.; AYANDELE, A. Antimicrobial activity of aqueous and ethanolic extracts from *Tithonia diversifolia* and *Bryum coronatum* collected from Ogbomoso, Oyo state, Nigeria. **Advances in Natural and Applied Sciences**, v. 2, n. 1, p. 31–34, 2008.

LIN, L.-C.; KUO, Y.-C.; CHOU, C.-J. Immunomodulatory Principles of *Dichrocephala bicolor*. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 3, p. 405–408, mar. 1999.

LUKAS, B.; SCHMIDERER, C.; FRANZ, C.; NOVAK, J. Composition of essential oil compounds from different Syrian populations of *Origanum syriacum* L. (Lamiaceae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 4, p. 1362–1365, 25 fev. 2009.

MARSCHNER, H. **Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants**. 2^a edição. Editora Gulf Professional Publishing, 1995.

MENUT, C.; LAMATY, G.; ZOLLO, P.-H. A.; KUIATE, J. R.; BESSIÈRE, J.-M. Aromatic Plants of Tropical Central Africa. IX. Chemical Composition of Flower Essential Oils of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray from Cameroon. **Journal of Essential Oil Research**, v. 4, n. 6, p. 651–653, nov. 1992.

MINOTTI, G.; AUST, S. D. The role of iron in oxygen radical mediated lipid peroxidation. **Chemico-Biological Interactions**, v. 71, n. 1, p. 1–19, jan. 1989.

MIRANDA, M. A. F. M.; VARELA, R. M.; TORRES, A.; MOLINILLO, J. M. G.; GUALTIERI, S. C. J.; MACÍAS, F. A. Phytotoxins from *Tithonia diversifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 78, p. 1083–1092, 2015.

MORISON, J. I. L.; LAWLOR, D. W. Interactions between increasing CO₂ concentration and temperature on plant growth. **Plant, Cell and Environment**, v. 22, p. 659–682, 1999.

MORLIÈRE, P.; MOYSAN, A.; SANTUS, R.; HÜPPE, G.; MAZIÈRE, J.-C.; DUBERTRET, L. UVA-induced lipid peroxidation in cultured human fibroblasts. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism**, v. 1084, n. 3, p. 261–268, jul. 1991.

MORONKOLA, D. O.; OGUNWANDE, I. A.; WALKER, T. M.; SETZER, W. N.; OYEWOLE, I. O. Identification of the main volatile compounds in the leaf and flower of *Tithonia diversifolia* (Hemsl) Gray. **Journal of Natural Medicines**, v. 61, n. 1, p. 63–66, 1 set. 2006.

NASCIMENTO, G. C. **Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antitumoral e citotoxicidade in vitro de *Erythroxylum deciduum* (Erythroxylaceae)**. 2008. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Moleculares). Universidade Estadual de Goiás. Anápolis.

NICHOLS, J. A.; KATIYAR, S. K. Skin photoprotection by natural polyphenols: Anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. **Archives of Dermatological Research**, v. 302, n. 2, p. 71–83, 2010.

OBAFEMI, C.; SULAIMON, T.; AKINPELU, D.; OLUGBADE, T. Antimicrobial activity of extracts and a germacranolidetype sesquiterpene lactone from *Tithonia diversifolia* leaf extract. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. June, p. 1254–1258, 2006.

OECD. In Vitro 3T3 NRU phototoxicity test. **Test**, n. April, p. 1–15, 2004.

OGAWA, K.; SASHIDA, Y. Caffeoyle derivatives of a sugar lactone and its hydroxy acid from the leaves of *Bidens pilosa*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 10, p. 3657–3658, out. 1992.

OWOYELE, V. B.; WURAOLA, C. O.; SOLADOYE, A. O.; OLALEYE, S. B. Studies on the anti-inflammatory and analgesic properties of *Tithonia diversifolia* leaf extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, n. 2-3, p. 317–321, fev. 2004.

OYEWOLE, I. O.; ADEOYE, G. O.; ANYASOR, G.; OBANSA, J. A. Anti-malarial and repellent activities of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) leaf extracts. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 2, n. 8, p. 171–175, 2008.

PASSONI, F. D.; OLIVEIRA, R. B.; CHAGAS-PAULA, D. A.; GOBBO-NETO, L.; DA COSTA, F. B. Repeated-dose toxicological studies of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. gray and identification of the toxic compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 147, n. 2, p. 389–394, 20 maio 2013.

PAULI, G. F.; POETSCH, F.; NAHRSTEDT, A. Structure assignment of natural quinic acid derivatives using proton nuclear magnetic resonance techniques. **Phytochemical Analysis**, v. 9, p. 177–185, 1998.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à Espectroscopia - Tradução da quarta edição norte-americana**. 4^a edição. São Paulo: Cenage Learning, 2010.

PÉREZ-SÁNCHEZ, A.; BARRAJÓN-CATALÁN, E.; CATURLA, N.; CASTILLO, J.; BENAVENTE-GARCÍA, O.; ALCARAZ, M.; MICOL, V. Protective effects of citrus and rosemary extracts on UV-induced damage in skin cell model and human volunteers. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 136, p. 12–18, 2014.

PRESTCH, E.; BÜHLMANN, P.; BADERTSCHER, M. **Structure Determination of Organic Compounds**. 4^a edição. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009.

PSOTOVA, J.; SVOBODOVA, A.; KOLAROVA, H.; WALTEROVA, D. Photoprotective properties of *Prunella vulgaris* and rosmarinic acid on human keratinocytes. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 84, n. 3, p. 167–174, 2006.

RAMAKRISHNA, A.; RAVISHANKAR, G. A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. **Plant Signaling & Behavior**, v. 6, n. 11, p. 1720–1731, nov. 2011.

REDDY, A. R.; CHAITANYA, K. V.; VIVEKANANDAN, M. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 161, n. 11, p. 1189–1202, nov. 2004.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free radical biology and medicine**, v. 20, n. 7, p. 933–956, 1996.

RODRIGUEZ, E.; TOWERS, G. H. N.; MITCHELL, J. C. Biological activities of sesquiterpene lactones. **Phytochemistry**, v. 15, n. 11, p. 1573–1580, 1976.

SÁNCHEZ-MENDOZA, M. E.; REYES-RAMÍREZ, A.; CRUZ ANTONIO, L.; MARTÍNEZ JIMÉNEZ, L.; RODRÍGUEZ-SILVERIO, J.; ARRIETA, J. 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. 665–74, jan. 2011.

SANTOS, M. D. DOS. ***Lychnophora ericoides* Mart.:** avaliação farmacológica e considerações sobre o metabolismo oxidativo das substâncias bioativas. 2006. 140 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto.

SANTOS, R. I. DOS. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. DE; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Eds.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6^a edição. Porto Alegre; Florianópolis: Editora UFRGS/Editora UFSC, 2007. p. 403–434.

SANTOS, R. M. S.; SANTOS, M. F. Quimoluminescência e bioluminescência. **Química Nova**, v. 16, n. 3, p. 200-209, 1992.

SARTOR, T.; XAVIER, V. B.; FALCÃO, M. A.; MONDIN, C. A.; DOS SANTOS, M. A.; CASSEL, E.; ASTARITA, L. V.; SANTARÉM, E. R. Seasonal changes in phenolic compounds and in the biological activities of *Baccharis dentata* (Vell.) G.M. Barroso. **Industrial Crops and Products**, v. 51, p. 355–359, nov. 2013.

SATAKE, T.; KAMIYA, K.; AN, Y.; OISHI NEE TAKA, T.; YAMAMOTO, J. The anti-thrombotic active constituents from *Centella asiatica*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 5, p. 935–940, 2007.

SCHREINER, M.; MEWIS, I.; HUYSKENS-KEIL, S.; JANSEN, M. A. K.; ZRENNER, R.; WINKLER, J. B.; O'BRIEN, N.; KRUMBEIN, A. UV-B-Induced Secondary Plant Metabolites - Potential Benefits for Plant and Human Health. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 31, n. 3, p. 229–240, maio 2012.

SHI, S.; HUANG, K.; ZHANG, Y.; ZHAO, Y.; DU, Q. Purification and identification of antiviral components from *Laggera pterodonta* by high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 859, n. 1, p. 119–124, 2007.

SHULAEV, V.; CORTES, D.; MILLER, G.; MITTLER, R. Metabolomics for plant stress response. **Physiologia Plantarum**, v. 132, n. 2, p. 199–208, fev. 2008.

SHYUR, L.; TSUNG, J.; CHEN, J.; CHIU, C.-Y.; LO, C.-P. Antioxidant Properties of Extracts from Medicinal Plants Popularly Used in Taiwan. **International Journal of Applied Science and Engineering**, v. 3, n. 3, p. 195–202, 2005.

SIATKA, T.; KAŠPAROVÁ, M. Seasonal variation in total phenolic and flavonoid contents and DPPH scavenging activity of *Bellis perennis* L. flowers. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 15, n. 12, p. 9450–9461, jan. 2010.

SILVA, E. G. DA; BEHR, G. A.; ZANOTTO-FILHO, A.; LORENZI, R.; PASQUALI, M. A. D. B.; RAVAZOLO, L. G.; BORDIGNON, C. L.; SILVA, F. A. DA; ABOY, A. L.; BASSANI, V. L.; HENRIQUES, A. T.; REGINATTO, F. H.; DAL-PIZZOL, F.; MOREIRA, J. C. F. Antioxidant activities and free radical scavenging potential of *Bauhinia microstachya* (RADDI) MACBR. (Caesalpinaceae) extracts linked to their polyphenol content. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 8, p. 1488–1496, 2007.

SILVA, P. C. DE S. C. E. **Efeito da variação sazonal na produção de compostos ativos em *Tithonia diversifolia* (HEMSL) Gray, utilizando ensaio com microrganismos.** 2004. 37 f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo. Piracicaba.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos.** Sexta edição. Rio de Janeiro: LTC - Livros Técnicos e Científicos Editora, 2000.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; BAUER, L.; LANGELOH, A. Pharmacological investigations on *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., Compositae. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 22, n. 3, p. 281–293, abr. 1988.

STASHENKO, E. E.; MARTÍNEZ, J. R.; RUÍZ, C. A.; ARIAS, G.; DURÁN, C.; SALGAR, W.; CALA, M. *Lippia origanoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. **Journal of Separation Science**, v. 33, n. 1, p. 93–103, jan. 2010.

TENG, R. W.; WANG, D. Z.; WU, Y. S.; LU, Y.; ZHENG, Q. T.; YANG, C. R. NMR assignments and single-crystal X-ray diffraction analysis of deoxyloganic acid. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 43, n. 1, p. 92–96, 2005.

TREUTTER, D. Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis. **Plant Biology**, v. 7, n. 6, p. 581–591, nov. 2005.

TREUTTER, D. Significance of flavonoids in plant resistance: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 4, n. 3, p. 147–157, 7 jul. 2006.

UPADHYAY, R.; MOHAN RAO, L. J. An outlook on chlorogenic acids-occurrence, chemistry, technology, and biological activities. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 53, n. 9, p. 968–984, jan. 2013.

URIBURU, M. L.; GIL, R. R.; SOSA, V. E.; FUENTE, J. R. DE LA. Caffeoyl esters of threonic acid and its lactone from *Viguiera pazensis*. **Journal of the Argentine Chemical Society**, v. 96, n. 1-2, p. 55–61, 2008.

VICENTINI, F. T. M. C.; HE, T.; SHAO, Y.; FONSECA, M. J. V.; VERRI, W. A.; FISHER, G. J.; XU, Y. Quercetin inhibits UV irradiation-induced inflammatory cytokine production in primary human keratinocytes by suppressing NF- κ B pathway. **Journal of dermatological science**, v. 61, n. 3, p. 162–168, mar. 2011.

WAHYUNINGSIH, M. S. H.; WIJAYANTI, M. A.; BUDIYANTO, A.; HANAFI, M. Isolation and identification of potential cytotoxic compound from Kembang Bulan [*Tithonia diversifolia* (Hemsley) A Gray] leaves. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 6, p. 298–301, 2015.

WANG, H.; JOSEPH, J. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, n. 5-6, p. 612–616, 1999.

WARD, J. H. Hierarchical Grouping to Optimize an Objective Function. **Journal of the American Statistical Association**, v. 58, n. 301, p. 236–244, 1963.

WINTERBOURN, C. C. Toxicity of iron and hydrogen peroxide: The Fenton reaction. **Toxicology Letters**, v. 82-83, p. 969–974, 1995.

ZHAO, G.; LI, X.; CHEN, W.; XI, Z.; SUN, L. Three new sesquiterpenes from *Tithonia diversifolia* and their anti-hyperglycemic activity. **Fitoterapia**, v. 83, n. 8, p. 1590–1597, 2012a.

ZHAO, G.-J.; XI, Z.-X.; CHEN, W.-S.; LI, X.; SUN, L.; SUN, L.-N. Chemical constituents from *Tithonia diversifolia* and their chemotaxonomic significance. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 44, p. 250–254, out. 2012b.

APÊNDICE A

Espectro de RMN ^1H (400 MHz) da substância FBEAF 7.25. Solvente: CD_3OD .

APÊNDICE B

Espectro de RMN ^1H (400 MHz) da substância FBEAF 7.25-lac. Solvente: CD_3OD .

APÊNDICE C

Espectro de RMN ^1H (400 MHz) da substância FAELI 4.5. Solvente: CD_3OD .

APÊNDICE D

Espectro de RMN ^1H (400 MHz) da substância FAEAI 4.6. Solvente: CD_3OD .

APÊNDICE E

Espectro de RMN ^1H (400 MHz) da substância FAELAI 4.9. Solvente: CD_3OD .

APÊNDICE F

Espectro de RMN ^1H (400 MHz) da substância FAELI 5.5. Solvente: CD_3OD .

APÊNDICE G

Espectro de RMN ^1H (400 MHz) da substância FAEAI 5.6. Solvente: CD_3OD .

APÊNDICE H

Espectro de RMN ^1H (400 MHz) da substância FAEAI 5.8. Solvente: CD_3OD .

APÊNDICE I

Espectro de RMN bidimensional do tipo *HSQC* (400 MHz) da substância FBEAF 7.25. Solvente: CD₃OD.

APÊNDICE J

Espectro de RMN bidimensional do tipo *HSQC* (400 MHz) da substância FBEAF 7.25-lac. Solvente: CD₃OD.

APÊNDICE K

Espectro de RMN bidimensional do tipo *HSQC* (400 MHz) da substância FAEAI 4.5. Solvente: CD₃OD.

APÊNDICE L

Espectro de RMN bidimensional do tipo *HSQC* (400 MHz) da substância FAEAI 4.6. Solvente: CD₃OD.

APÊNDICE M

Espectro de RMN bidimensional do tipo *HSQC* (400 MHz) da substância FAEAI 4.9. Solvente: CD₃OD.

APÊNDICE N

Espectro de RMN bidimensional do tipo *HSQC* (400 MHz) da substância FAEAI 5.5. Solvente: CD₃OD.

APÊNDICE O

Espectro de RMN bidimensional do tipo *HSQC* (400 MHz) da substância FAEAI 5.6. Solvente: CD₃OD.

APÊNDICE P

Espectro de RMN bidimensional do tipo *HSQC* (400 MHz) da substância FAEAI 5.8. Solvente: CD₃OD.

APÊNDICE Q

Espectro de RMN bidimensional do tipo *HMBC* (400 MHz) da substância FBEAF 7.25. Solvente: CD₃OD.

APÊNDICE R

Espectro de RMN bidimensional do tipo *HMBC* (400 MHz) da substância FBEAF 7.25-lac obtido com valor de acoplamento $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ igual a 5,0 Hz. Solvente: CD_3OD . Destaque: sinal referente ao acoplamento entre H-3' e C-5'.

APÊNDICE S

Espectro de RMN bidimensional do tipo *HMBC* (400 MHz) da substância FBEAF 7.25-lac obtido com valor de acoplamento $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ igual a 8,0 Hz. Solvente: CD_3OD . Destaque: sinal referente ao acoplamento entre H-3' e C-5'.

APÊNDICE T

Espectro de RMN bidimensional do tipo *HMBC* (400 MHz) da substância FBEAF 7.25-lac obtido com valor de acoplamento $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ igual a 12,0 Hz. Solvente: CD_3OD .

APÊNDICE U

Espectro de RMN bidimensional do tipo *HMBC* (400 MHz) da substância FAEAI 4.5. Solvente: CD₃OD.

APÊNDICE V

Espectro de RMN bidimensional do tipo *HMBC* (400 MHz) da substância FAEAI 4.6. Solvente: CD_3OD .

APÊNDICE W

Espectro de RMN bidimensional do tipo *HMBC* (400 MHz) da substância FAEAI 4.9. Solvente: CD₃OD.

APÊNDICE X

Espectro de RMN bidimensional do tipo *HMBC* (400 MHz) da substância FAEAI 5.5. Solvente: CD₃OD.

APÊNDICE Y

Espectro de RMN bidimensional do tipo *HMBC* (400 MHz) da substância FAEAI 5.6. Solvente: CD₃OD.

APÊNDICE Z

Espectro de RMN bidimensional do tipo *HMBC* (400 MHz) da substância FAEAI 5.8. Solvente: CD₃OD.

APÊNDICE AA

S-line plot para os dados de RMN (*J-resolved*) dos extratos de folhas de *T. diversifolia* sobreposto pelos espectros de RMN ^1H das substâncias discriminantes para os grupos GF1 (vermelho) e GF3 (azul). Os círculos indicam os valores de deslocamento químico discriminantes para os dois grupos propostos. Os espectros em vermelho foram obtidos a partir das lactonas sesquiterpênicas tagitinina A, tagitinina C e tagitinina C epóxido, e os espectros em azul a partir dos derivados cafeoilquínicos ácido clorogênico e ácido 3,5-*O*-dicafeoilquínico.

APÊNDICE BB

S-line plot para os dados de RMN (*J-resolved*) dos extratos de caules de *T. diversifolia* sobreposto pelos espectros de RMN ^1H das substâncias discriminantes para os grupos GC2 (vermelho) e GC3 (azul). Os círculos indicam os valores de deslocamento químico discriminantes para os dois grupos propostos. O espectro em vermelho foi obtido a partir do metabólito primário glicose e os espectros em azul a partir dos derivados cafeoilquínicos ácido clorogênico e ácido 3,5-*O*-dicafeoilquínico.

APÊNDICE CC

S-line plot para os dados de RMN (*J-resolved*) dos extratos de raízes de *T. diversifolia* sobreposto pelos espectros de RMN ^1H das substâncias discriminantes para os grupos GR1 (vermelho) e GR3 (azul). Os círculos indicam os valores de deslocamento químico discriminantes para os dois grupos propostos. Os espectros em vermelho foram obtidos a partir dos metabólitos primários glicose e timidina, e os espectros em azul a partir dos derivados cafeoilquínicos ácido clorogênico e ácido 3,5-*O*-dicafeoilquínico.

APÊNDICE DD

S-line plot para os dados de RMN (*J-resolved*) dos extratos de inflorescências de *T. diversifolia* sobreposto pelos espectros de RMN ^1H das substâncias discriminantes para os grupos GI1 (azul) e GI2 (vermelho). Os círculos indicam os valores de deslocamento químico discriminantes para os dois grupos propostos. Os espectros em azul foram obtidos a partir do metabólito primário glicose e das lactonas sesquiterpênicas tagitinina A, tagitinina C e tagitinina C epóxido, e os espectros em vermelho a partir dos derivados cafeoilquínicos ácido clorogênico e ácido 3,5-*O*-dicafeoilquínico.