



SÃO LUCAS
CENTRO UNIVERSITÁRIO

DÉBORA JOSÉ DA SILVA

FERNANDO NASCIMENTO DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DA GENOTOXIDADE E MUTAGENICIDADE DA *TITHONIA*
DIVERSIFOLIA EM *ALLIUM CEPA***

Ji-paraná

2019

DÉBORA JOSÉ DA SILVA
FERNANDO NASCIMENTO DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DA GENOTOXIDADE E MUTAGENICIDADE DA *TITHONIA*
DIVERSIFOLIA EM *ALLIUM CEPA***

Artigo apresentado no Curso de Biomedicina em Trabalho de Conclusão de Curso do Centro Universitário São Lucas de Ji-Paraná 2019, como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Profa. Dra. Natália Malavasi Vallejo.

JI-PARANÁ – RO

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Gerada automaticamente mediante informações fornecidas pelo(a) autor(a)

S586s Silva, Debora Jose da.

Avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade da Tithonia
Diversifolia em Allium Cepa / Debora José da Silva, Fernando
Nascimento de Souza. -- Ji-Paraná, RO, 2019.

18, p.

Orientador(a): Prof. Natalia Malavasi Vallejo

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina)
- Centro Universitário São Lucas

1. Plantas medicinais. 2. Margaridão. 3. Alternativa
terapêutica. I. Souza, Fernando Nascimento de. II. Vallejo,
Natalia Malavasi. III. Título.

CDU 615.82

Bibliotecário(a) Alex Almeida CRB 11.853

DÉBORA JOSÉ DA SILVA
FERNANDO NASCIMENTO DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DA GENOTOXIDADE E MUTAGENICIDADE DA *TITHONIA*
DIVERSIFOLIA EM *ALLIUM CEPA***

Artigo apresentado a Banca Examinadora do Centro Universitário São Lucas de Ji-Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Biomedicina.
Orientadora: Profa. Dra. Natalia Malavasi Vallejo

Ji-Paraná, 29 de novembro de 2019.

Avaliação/Nota:

BANCA EXAMINADORA

Resultado: _____

Antelmo de Souza Ferreira

Adriano Marco Romano

Natalia Malavasi Vallejo

Secretaria Municipal de Saúde

Centro Universitário São Lucas

Centro Universitário São Lucas

AVALIAÇÃO DA GENOTOXIDADE E MUTAGENICIDADE DA *THITONIA DIVERSIFOLIA* EM *ALLIUM CEPA*¹

Débora José da Silva²
Fernando Nascimento de Souza³

RESUMO: A utilização de plantas como intervenção medicamentosa tem uma grande força entre a população desde os primórdios. Antes mesmo dos fármacos serem implantados, muitas dessas plantas foram utilizadas por anos passando de gerações entre grupos familiares sem uma verificação correta de sua genotoxicidade ou mutagenicidade. O objetivo do trabalho é avaliar o grau do potencial mutagênico e genotóxico presentes no extrato aquoso e etanólico, preparados através da utilização da planta *Tithonia diversifolia* (popular margaridão ou girassol mexicano), planta de fácil acesso na Amazônia legal da família *Asteraceae*, que apesar de ser aproveitada como enfeite pelo seu aspecto robusto, seu extrato tem sido utilizado a fins medicinais para o tratamento em alguns países. No Brasil conforme DA SILVA et al, 2012 em ações anti-inflamatórias, antimaláricas e diabetes. Por método de *Allium cepa*, teste utilizado através de cebolas comuns, devido sua alta sensibilidade, baixo custo, agilidade e de fácil manipulação que segundo LEME e MARIN MORALES 2009, demonstram a diminuição do índice mitótico e formação de aberrações cromossômicas, comparando o crescimento das raízes nos extratos. Assim foi possível obter um resultado após as análises realizadas com o material coletado, observando que no extrato aquoso somente a maior concentração de 1000 µg/mL obteve significância com o controle negativo (CN), já no crescimento radicular do extrato etanólico o nível de toxicidade das concentrações foram maiores, devido o extrato etanólico em suas maiores concentrações (1000, 500 e 250 µg/mL) quando comparadas ao controle positivo (CP), e uma diferença significativa comparada ao controle negativo (CN) demonstrando um nível de citotoxicidade alto, fazendo com que o crescimento radicular tivesse prejuízo.

Palavras-chave: Mutagenicidade, Genotoxicidade, *Tithonia diversifolia*, *Allium cepa*.

¹ Artigo apresentado no curso de graduação em Biomedicina do Centro Universitário São Lucas 2019, como Pré-requisito para conclusão do curso, sob orientação da professora Doutora Natália Malavasi Vallejo. E-mail: malavasinv@gmail.com.

² Débora José da Silva, graduanda do curso de Biomedicina do Centro Universitário São Lucas, 2019. E-mail: deborasilva95@hotmail.com.

³ Fernando Nascimento de Souza, graduando do curso de Biomedicina do Centro Universitário São Lucas, 2019. E-mail: fernandoo_souza@hotmail.com.

GENOTOXICITY AND MUTAGENICITY EVALUATION OF *TITHONIA DIVERSIFOLIA* IN *ALLIUM CEPA*

ABSTRACT: The use of plants as a drug intervention has had a strong force among the population since the beginning. Even before drugs were implanted, many of these plants have been used for years going from generations between family groups without a correct verification of their genotoxicity or mutagenicity. The objective of this work is to evaluate the degree of mutagenic and genotoxic potential present in the aqueous and ethanolic extract, prepared through the use of the plant *Tithonia diversifolia* (popular daisy or Mexican sunflower), a plant easily accessible in the legal Amazon of the Asteraceae family. Although it is used as a decoration for its robust appearance, its extract has been used for medicinal purposes for treatment in some countries and even in Brazil according to DA SILVA et al, 2012 in anti-inflammatory, antimalarial and diabetes. By *Allium cepa* method, a test used through common onions, due to its high sensitivity, low cost, agility and easy handling, which according to LEME and MARIN MORALES 2009, demonstrate the reduction of the mitotic index and formation of chromosomal aberrations, comparing the growth of roots in the extracts. Thus it was possible to obtain a result after the analyzes performed with the collected material, observing that in the aqueous extract only the highest concentration of 1000 µg / mL was significant with the negative control (CN), while in the root growth of the ethanolic extract the level of toxicity. concentrations were higher due to the ethanolic extract at its highest concentrations (1000, 500 and 250 µg / mL) when compared to the positive control (PC), and a significant difference compared to the negative control (CN) showing a high level of cytotoxicity, causing root growth to be impaired.

Keywords: Mutagenicity, Genotoxicity, *Tithonia diversifolia*, *Allium cepa*.

1. INTRODUÇÃO

O uso das plantas para fins medicinais vem de muitas gerações e até hoje está abundantemente presente no cotidiano da população. Conforme a Organização Mundial da Saúde (OMS) tem como significado de planta medicinal o vegetal que apresenta substâncias com fins terapêuticos que se tornem antecessores de medicações semissintéticas. A utilização das plantas medicinais no Brasil é consumida com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, mas vem sendo ainda propagada por usuários e comerciantes. Apesar de comparados com medicações utilizadas em tratamentos convencionais, seu efeito tóxico não pode ser irrelevante, pois podem causar ações sinérgicas, por exemplo, fazendo com que esse fitomedicamento se torne um risco sério a saúde pública. [1]

Conforme estimativa levantada pela OMS, 80% da população mundial utilizam-se para suprir as necessidades terapêuticas, coincidindo com a realidade também de países desenvolvidos o uso de ervas para fim medicinal, haja vista que foi observado que nos Estados Unidos, 25 % das indicações médicas receitadas no período final da década de 50 a meados dos anos 80 continham princípios ativos obtidos ou fragmentos vegetais por plantas superiores. Mais tarde, no final da década de 90 uma pesquisa realizada constatou que 43% da população em tratamentos médicos alternativos fizeram o uso de plantas medicinais, um crescimento cerca de 30% do início de 1990 quando a mesma pesquisa foi realizada. [1,2] Para obter um conhecimento necessário e não correr tal risco, o crescimento de pesquisas e estudos a respeito do dano da toxicidade e mutagenicidade de plantas de uso popular tem se elevado a fim de uma melhor disciplina no seu uso terapêutico.

A *Thithonia diversifolia* é uma planta muito conhecida e utilizada na medicina popular, conhecida como margaridão ou girassol mexicano. Sua origem é nativa do sudeste mexicano e pode ser localizada em diversas regiões e ecossistemas pelo mundo, com fácil acesso na Amazônia legal, podendo ser encontrada ao longo de rodovias e em terrenos baldios, pela sua característica invasora de enraizamento em diversificados solos, com um ciclo de vida perene. Seu florescimento depende muito

da época em que foi realizado o seu plantio, sendo capaz de florescer na primavera, verão e outono. [3]

Suas folhas possuem recorte com coloração em verde escuro, com presença de tricomas que podem em alguns casos apresentar um processo alérgico em quem faz o manuseio da mesma, suas flores são de característica similar a um girassol, com sua coloração amarelada e suas pétalas de aspecto alongado. Sua proliferação ocorre pela dispersão das sementes, devido ser uma planta com uma rusticidade, ela consegue se reproduzir e multiplicar facilmente, se o solo estiver apropriado para a sua germinação. [4]

Erva da família *Asteraceae*, robusta e comumente aproveitada como enfeite de jardim devido seu aspecto de ornamentação com flores formosas. Entretanto seus extratos têm demonstrado eficácia no combate às inflamações, malárias e no tratamento de algumas diabetes tanto no Brasil, como também em outros países que testam em animais de laboratório em estudos *in vitro* ou *in vivo*. [5]

Em muitos casos as plantas medicinais não tem uma análise adequada para o conhecimento do grau de toxidade e mutagenicidade, levando em consideração que o solo, ou mesmo a planta pode estar contaminada por outros agentes. A *T. diversifolia* também tem sido recomendada na terapia contra o uso de drogas, colocando uma pitada do extrato sobre a língua nos momentos de maior vontade de usar as drogas que estão lutando contra, orientando a fazer este uso em ate seis vezes ao dia. [6]

Uma vez que essa planta vem ganhando conhecimento populacional e científico, conseqüentemente com isso novos estudos vêm sendo realizados para observar seus riscos e suas vantagens. Um dos estudos mais utilizados para verificar o nível de toxidade e mutagenicidade em plantas, é realizado através de pesquisa com cebolas (*Allium cepa*), que é indicado para averiguar os compostos, haja vista algumas considerações pertinentes para tal realização além do cunho financeiro, tais como: fácil aproveitamento e manipulação das amostras sem um tratamento específico, agilidade e alta sensibilidade para demonstração de formação de possíveis aberrações cromossômicas e diminuição do índice mitótico. [7]

O teste utiliza concentrações preparadas a partir dos extratos da planta que será analisada, através do crescimento das raízes das cebolas. Com a análise microscópica dos meristemas, é possível obter um resultado de grande relevância nas pesquisas, em virtude de sua capacidade em analisar o nível de mutagenicidade/genotoxicidade dos extratos preparados para a análise. Com isso, o presente estudo tem como objetivo analisar o grau de citotoxicidade e mutagenicidade/genotoxicidade das folhas da *Tithonia diversifolia*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 COLETA DA PLANTA E PREPARO DOS EXTRATOS

No município de Ji-Paraná – Rondônia, Brasil, Latitude 10°51'52.1"S e Longitude 61°56'40.8" no mês de Junho, foram realizado identificação e catalogação das folhas da planta e encaminhado ao herbário São Lucas de Porto Velho – RO, registrado como o exemplar nº 413. No mês de setembro foi coletado o material, lavado em água corrente, e levada à estufa por 72 horas a 40°C.

Após a secagem em estufa, as folhas foram trituradas com o auxílio de um moinho de facas modelo Wiley, em seguida para a obtenção dos extratos foram pesadas, e utilizou a mistura de 500 ml de água destilada e 125g da folha seca e triturada, levado ao Banho-maria por 1 hora à 80°C, de acordo com adaptação descrita por Di Giacomo et al, (2015). [8]

Para o preparo do extrato etanólico foi então adaptado e preparado de acordo como descrito por Lima (2006), adicionado 880 ml de etanol PA 95 e 220g de folhas secas trituradas, após o preparo foi embalado e vedado o recipiente, e armazenado por sete dias. [9] No preparo para obtenção dos extratos brutos de aquoso e etanólico, foram filtrados com papel filtro e distribuídos em placas de petri, e levados à estufa a 45°C por 72 horas, e armazenado a 4°C na geladeira até o início dos experimentos. [9]

Cada extrato foi pesado e realizado a diluição dos extratos brutos dissolvidos em água destilada, para o preparo das diluições seriadas.

No preparo da concentração dos controles, foi utilizado para o controle positivo sulfato de cobre diluído em 1 ml de água destilada, no controle negativo foi utilizado água destilada e distribuído em 7 potes coletores estéreis de 50 ml, e

adicionado as cebolas sobre eles, a qual foi o mesmo parâmetro para ambas concentrações (aquoso e etanólico). No extrato aquoso foram preparadas diluições com concentrações de 2000, 1000, 500, 250, 125 e 62,5%, já no extrato etanólico a concentração inicial foi de 1000, 500, 250, 125 e 62,5%, após foram distribuídos nos 7 potes coletores estéreis de cada concentração e adicionado as cebolas sobre eles em contato com os extratos nas respectivas concentrações, durante 72h em temperatura constante de 25°C.

2.2 BIOENSAIO COM *ALLIUM CEPA*

As cebolas utilizadas foram compradas em uma feira municipal na cidade de Ji-Paraná, de acordo com os critérios de inclusão, foram analisadas e selecionadas àquelas que tinham seu tamanho uniforme, médio, não germinadas e saudáveis. Em seguida foram descascadas, lavadas em água de torneira e colocadas em um recipiente com água durante um período de 3 horas, com objetivo de evitar o surgimento de substâncias que prejudicariam o desenvolvimento e crescimento dos bulbos das cebolas. [10]

O bulbo das cebolas (raízes) foi colocado em contato com as diferentes concentrações dos extratos aquoso e etanólico e foram mantidas a 25°C com luminosidade adequada durante 72 horas. Os meristemas foram cortados com um bisturi e medidos com o auxílio de uma régua milimetrada. Os meristemas cortados foram armazenados em eppendorfs contendo Solução de Carnoy. Posteriormente foram lavados em água destilada e hidrolisados em HCl 1N durante 10 minutos em banho-maria a 60°C, sendo novamente lavados com água destilada. [10] Em seguida os meristemas foram cortados e corados com Panótico Rápido LB (Laborclin) e depois realizado a técnica de esmagamento, com auxílio da lamínula, as lâminas foram feitas em duplicatas. [11]

A leitura microscópica foi realizada utilizando a objetiva de 100x, obtendo um aumento de 1000x, desta forma assim podendo identificar a presença de micronúcleos e as diferentes fases da divisão celular, analisando 1000 células por lâmina.

O índice mitótico foi calculado segundo literatura, onde é dividido o número de células em mitose (prófase, metáfase, anáfase e telófase) pelo número total de

células (intérfase e mitose) e multiplicado por 100, obtendo-se o resultado em porcentagem. [12]

Para a construção dos gráficos foi utilizado o software Graphpad Prism 5.01 e a análise estatística foi realizada pelo método de Tukey, considerando os resultados significativos para $p < 0,05$ averiguando os resultados por meio de variância ANOVA.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 1 apresenta a média do crescimento radicular de *Allium cepa*, posteriormente a exposição a extratos aquoso e etanólico (figura 1A e 1B, respectivamente). Pode-se observar no extrato aquoso que somente a maior concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ se mostrou diferente significativamente quando comparado ao controle negativo ($p < 0,05$) e as demais concentrações não apresentaram diferença significativa em relação ao controle negativo. Na figura 1B observou a média do crescimento radicular quando utilizado o extrato etanólico e pode-se observar que as três maiores concentrações do extrato de 1000, 500 e 250 $\mu\text{g/mL}$ obtiveram diferença significativa quando comparadas ao controle negativo, demonstrando um nível de citotoxicidade alto, fazendo com que o crescimento radicular tivesse prejuízo, variando entre 0,36 cm na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ e 0,92 cm na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$.

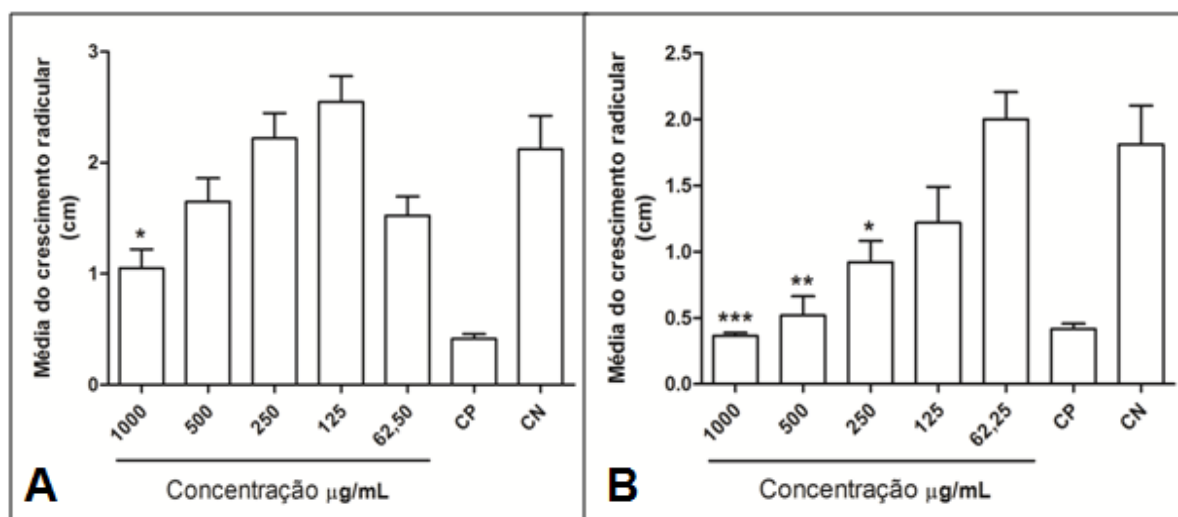


Figura 1. Média do crescimento radicular de *Allium cepa* em exposição a diferentes concentrações de extrato aquoso (A) e extrato etanólico (B) de folhas de *Thitonia diversifolia*. *** $p < 0,0001$ pelo método de Tukey (One Way ANOVA) Fonte: Arquivo pessoal.

Frente aos resultados apresentados nas figuras anteriores, houve consideravelmente uma diferença entre os extratos aquoso e etanólico, podendo observar que o fato do extrato etanólico haver sofrido um impacto ou uma diferença significativa maior no crescimento radicular com as três maiores concentrações (1000, 500 e 250 µg/mL), torna-se conseqüentemente, seu nível citotóxico maior comparado ao extrato aquoso, ou seja, compostos etanólicos carregaram um teor de polaridade elevado, demonstrando um ressaltado na toxicidade do E.E. (extrato etanólico) diante do crescimento radicular entre as raízes das cebolas.

Conforme estudos, as propriedades das plantas em seus extratos tem sim utilidade terapêutica para o tratamento de doenças (Chagas-Paula et al. 2012) e a família da *T. diversifolia* é uma grande espécie vítima de vários estudos para revelar seu potencial químico e suas diversidades, revelando seus constituintes usados para inflamação, antidiabética, antimicrobiana, quimiopreventiva nos casos de câncer, analgésica, antimalárica, antidiarreica, citotóxicas contra células tumorais, atuação repelentes, bioensetecida. [25]

Abe et al. 2015, investigaram que, pelo fato da planta apresentar notável atividade inflamatória e antitumoral, o potencial em neutrófilos sem decorrência significativa de apoptose, sucedendo em um excelente terapêutico anti-inflamatório devido investigação das lactonas sesquiterpênicas (LSTs). [24] Já Paula (2010), que constatou cerca de 20 substâncias da planta, entre elas as lactonas sesquiterpênicas (LSTs) e as flavonas e ácidos clorogênicos (ACGs), relata que a planta não produzirá os mesmos efeitos colaterais das AINES (Anti-inflamatórios não esteroidais), uma vez que não são os únicos compostos que contribuem para atividade anti-inflamatória da planta pelo fato da inibição tanto da formação de edema quanto no engajamento de células inflamatórias. Isto é, conforme Paula (2010) os extratos de *T. diversifolia* apresentam compostos significativos promissores para o desenvolvimento fitoterápico, e sendo fonte de complexos anti-inflamatórios merecem mais recursos e estudos mais aprofundados para consolidação dos achados. De comum modo, a *T. diversifolia* carrega em seus extratos, compostos capazes de inibir o crescimento de bactérias *Porphyromonas gingivalis*, como em forma de terpenóides, saponinas, alcaloides, taninos e flavonoides, porém há um cuidado na necessidade de mais pesquisas sobre, para

averiguar o grau de toxicidade encontrados nos extratos de *T. diversifolia* (Koptaria et al. 2015). [27, 28, 29]

O índice mitótico foi calculado e pode ser observado na figura 2, quando os bulbos foram submetidos às diferentes concentrações de extrato aquoso (figura 2A), é possível observar que nas duas concentrações maiores de 1000 e 500 $\mu\text{g/mL}$ houve diferença significativa em relação ao controle negativo, possivelmente indicando uma citotoxicidade corroborando com os resultados de tamanho das raízes. A concentração de 125 $\mu\text{g/mL}$ também se mostrou diferente significativamente em relação ao controle negativo, porém a mesma diferença é observada em relação ao controle positivo na mesma concentração e as demais concentrações de 250 e 62,5 $\mu\text{g/mL}$ não foi obtida diferença significativa em relação ao CN. No extrato etanólico, porém, as quatro maiores concentrações 1000, 500, 250 e 125 $\mu\text{g/mL}$ obtiveram diferença significativa em relação ao CN e apenas a menor concentração de 62,5 $\mu\text{g/mL}$ não teve diferença quando comparada ao CN.

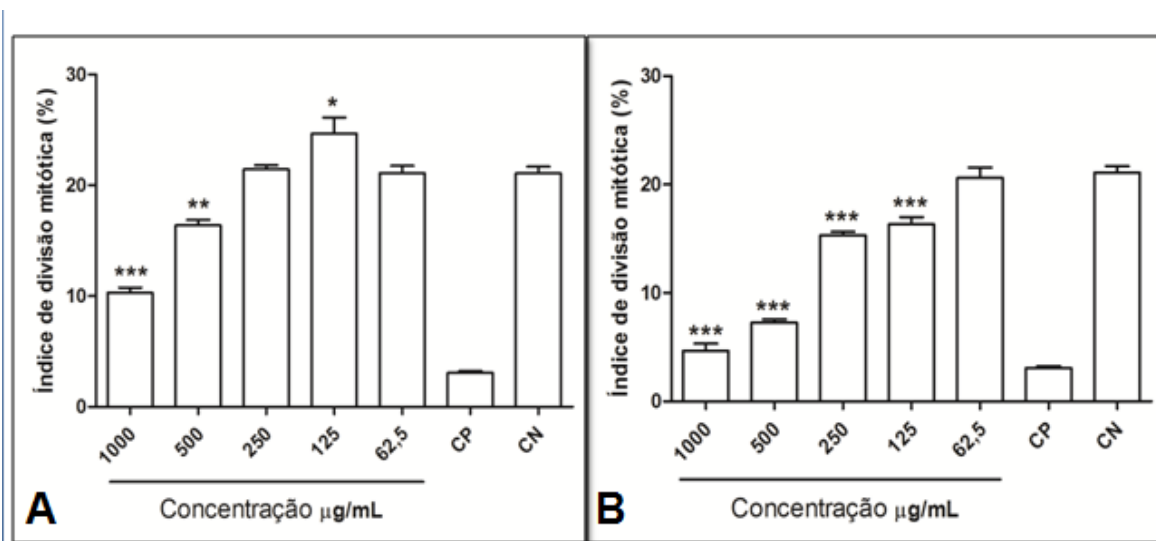


Figura 2. Índice de divisão mitótica do extrato aquoso (A) e extrato etanólico (B) das folhas de *Thitonia diversifolia* pelo método de Tukey (One Way ANOVA). **Fonte:** Arquivo pessoal.

O índice mitótico verifica a medida da agilidade que crescem e se dividem as células cancerígenas, no método de *A. cepa*, é analisado as aberrações cromossômicas em meristemas da ponta da raiz. Através do índice mitótico é possível detectar as possíveis alterações e prejuízos causados pelos agentes mutagênicos, através da avaliação das etapas da divisão celular durante o ciclo celular. Com a diminuição do crescimento das raízes ou do índice mitótico é possível

analisar a ação citotóxica, e avaliando a presença de micronúcleos ou anormalidade das etapas anáfase e telófase, é possível analisar a ação genotóxica.[13]

Os compostos alelopáticos são inibidores na germinação e no crescimento [23]. Através dos dados apresentados, pode-se observar que houve uma diferença de 10% entre a maior concentração e o CN no extrato aquoso e 15% no extrato etanólico em sua maior concentração de 1000 µg/mL, 7% entre as concentrações de 500 µg/mL e torno de 7% também na concentração de 250 µg/mL, havendo diferença na germinação comparada com a amostra controle positivo (CP) com menos de 5%, havendo interferentes na divisão celular de ambas as concentrações, pois o aumento no índice de divisão parece corroborar com os dados de germinação no teste.

Assim foi possível constatar que o extrato etanólico devido possivelmente extrair mais substâncias tóxicas do que o extrato aquoso obteve diferença representativa nos resultados obtidos, devido os resultados das diferentes concentrações testadas, utilizando os diferentes extratos.

4. CONCLUSÃO

Foi possível concluir que o uso do extrato da planta *Thitonia diversifolia* para o uso medicinal, quando preparado em extrato aquoso, seu nível de toxicidade e mutagenicidade, será significativamente menor que quando preparada a partir do seu extrato etanólico, devido seu efeito de citotoxicidade e mutagenicidade/genotoxicidade ser consideravelmente maior quando utilizado com o preparo do extrato etanólico, devido ao extrato etanólico ativar o efeito tóxico da planta, concluindo assim que seu uso deve ser realizado somente a partir do preparo por meio da utilização do extrato aquoso, gerando assim um risco inferior, porém não nulo de toxicidade.

REFERÊNCIAS

- [1] JUNIOR, Valdir F. Veiga; PINTO, Angelo C.; MACIEL, Maria Aparecida M. Plantas medicinais: cura segura. **Química nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.
- [2] ALMEIDA, Mara Zélia de. Plantas medicinais: abordagem histórico-contemporânea. **Plantas Medicinais [online]**, v. 3, p. 57, 2011.

- [3] *Tithonia* in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB16349>>. Acesso em: 15 Set. 2019.
- [4] PLANTA SONYA. (2019) Características do Margaridão (*Tithonia diversifolia*). Disponível em: <<http://www.plantasonya.com.br/flores-e-folhagens/caracteristicas-do-margaridao-tithonia-diversifolia.html>>.
- [5] DA SILVA, Nilma Paula Combras; VEIGA, Maria de Jesus Vitalls; MACHADO, Vera Lúcia Letizio. Entomofauna visitante de *tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray (Compositae) durante o seu período de floração. *Títulos não-correntes*, v. 13, n. 1/2, 2012.
- [6] TUDO SOBRE PLANTAS. (2018) *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A.Gray. Disponível em: <https://www.tudosobreplantas.com.br/asp/plantas/ficha.asp?id_planta=5233>.
- [7] LEME, Daniela Moraes; MARIN-MORALES, Maria Aparecida. Allium cepa test in environmental monitoring: a review on its application. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 682, n. 1, p. 71-81, 2009.
- [8] DI GIACOMO, C. et al. Effects of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray extract on adipocyte differentiation of human mesenchymal stem cells. **Plos One**, v. 10, n. 4, p. e0122320, 2015.
- [9] LIMA, Daniella Karine Souza; TEIXEIRA, César Augusto Domingues. Atividade inseticida e fungicida do Extrato Etanólico de *Pachira aquatica* AUBL sobre *Hypothenemus hampei* (FERRARI) e *Fusarium* sp. 2006.
- [10] CUCHIARA, C. C. Sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador da citogenotoxicidade de cursos d'água. *Tecnol. CiênAgropec.* João Pessoa, v. 6, n. 1, p. 33-38, 2012. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/292131315_Sistema_teste_de_Allium_cepa_como_bioindicador_da_citogenotoxicidade_de_cursos_d'agua. Acesso em: 07. Out. 2018.
- [11] POLETO, P.O., et al. Análise da mutagenicidade do extrato hidrossolúvel de *Derris ariflora* (Mart. ExBenth. J. F. Macbr: Fabaceae), timbó amazônico, através do teste micronúcleo em *Allium cepa*. **Rev. Pesquisa&Criação** 10: 163-175. 2011.
- [12] MENEGUETTI D.U.O., et al. Adaptation of the technical micronucleus in *Allium cepa*, to future analysis of mutagenicity of the rivers of the vale do Jamari-Rondônia, Brasil. Congresso Brasileiro da Sociedade Brasileira de Mutagenese Carcinogênese e Teratogênese Ambiental, São Paulo, Brasil. 2011.

- [13] VERRI, ANDRÉ MORADORE; MOURA, ANGÉLICA² DE ALMEIDA; DE MOURA, VAGNER MARQUES. Testes citogenéticos na avaliação da genotoxicidade de produtos naturais provindos de plantas medicinais. **Revista uningá review**, [s.l.], v. 30, n. 1, abr. 2017. Issn 2178-2571. Disponível em: <<http://revista.uninga.br/index.php/uningareviews/article/view/1997>>. Acesso em: 10 nov. 2019.
- [14] PIRES, N.M., et al. Efeito do extrato aquoso de leucena sobre o desenvolvimento, índice mitótico e atividade da peroxidase em plântulas de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** 13: 55–65. 2011.
- [15] NUNES, A.P.M. & ARAUJO, A.C. Ausência de genotoxicidade de estevioso em *E. coli*. In: Semana de Iniciação Científica da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 10, 2003, Rio de Janeiro. Anais. Rio de Janeiro, 2003. p.15.[acessado em: 02 out. 2019] Disponível em: http://www.unemat.br/eventos/jornada2009/resumos_conic/Expandido_00469.pdf.
- [16] BRAGA, Jacqueline Ramos Machado; LOPES, Diêgo Menezes. Citotoxicidade e genotoxicidade da água do rio Subaé (Humildes, Bahia, Brasil) usando *Allium cepa* L. como bioindicador. *Rev. Ambient. Água*, Taubaté, v. 10, n. 1, p. 130-140, mar. 2015.[acessado em: 02 out. 2019] Disponível em . <http://dx.doi.org/10.4136/ambi-agua.1459>.
- [17] DE FREITAS, Vinicius Marques et al. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TOXICA E CITOTÓXICA DE EXTRATOS DA PLANTA *Syzygium malaccense* (L.) Merr. & Perry. **South American Journal of Basic Education**, Technical and Technological, v. 6, n. 1, 2019.
- [18] REZENDE, H. A.; COCCO, M. I. M. A utilização de fitoterapia no cotidiano de uma população rural. **Rev Esc Enferm USP**, v. 36, n. 3, p. 282-8, 2002.
- [19] GUAN, Ying et al. Evaluation of Genotoxic and Mutagenic Activity of Organic Extracts from Drinking Water Sources. **Plos One**, v. 12, n. 1, p. e0170454, 2017.
- JUNIOR, Valdir F. Veiga; PINTO, Angelo C.; MACIEL, Maria Aparecida M. Plantas medicinais: cura segura. **Química nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.
- [20] CARNEIRO, C. C. Avaliação das atividades genotóxica, antigenotóxica, citotóxica, anticitotóxica, angiogênica e antiangiogênica de elagitaninos utilizando ensaios *in vitro* e *in vivo*. 2016. 122 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Goiás – UFG, Goiânia, 2016.

- [21] AYENI, AO; LORDBANJOU, DT; MAJEK, BA *Tithonia diversifolia* (girassol mexicano) no sudoeste da Nigéria: ocorrência e hábito de crescimento. **Pesquisa de ervas daninhas**, v. 37, n. 6, p. 443-449, 1997.
- [22] TAIWO, LB; MAKINDE, JO Influência do extrato aquoso de girassol mexicano (*Tithonia diversifolia*) no crescimento do feijão caupi (*Vigna unguiculata*). **Revista Africana de Biotecnologia**, v. 4, n. 4, p. 355-360, 2005.
- [23] BAGATINI, Margarete Dulce; SILVA, Antonio Carlos Ferreira da; TEDESCO, Solange Bosio. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 444-447, 2007.
- [24] IGANCI, J. R. V. et al. Efeito do extrato aquoso de diferentes espécies de boldo sobre a germinação e índice mitótico de *Allium cepa* L. *Arq Inst Biol*, v. 73, n. 1, p. 79-82, 2006.
- [25] 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** – Vol. 9. 2012.
- [26] ABE, A. E.; OLIVEIRA, C. E.; DALBONI, T. M.; CHAGAS-PAULA, D. A.; ROCHA, BRUNO A.; 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**, 25(2), 111-116. 2015.
- [27] PAULA, D. A. C. DE. **Atividade anti-inflamatória e caracterização fitoquímica do chá e de diferentes extratos de *Tithonia diversifolia* (Asteraceae)**. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.
- [28] KOPTARIA, A.; NAWAWI, S.; NINGSIH, J. R. Antibacterial properties of various concentration of mary gold leaves (*Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray) extract against *Porphyromonas gingivalis* dominant periodontitis (In Vitro). **jurnal ilmiah Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Muhammadiyah Surakarta**. 2015.
- [29] Tomasi, E. B. R. (2019). **Estudo do potencial inibitório da planta medicinal *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray na redução do biofilme periodontopatogênico**.