

Quimiodiversidade de Plantas dos Cerrados Piauienses

Ruth Raquel Soares de Farias
(Organizadora)



Atena
Editora
Ano 2020

Quimiodiversidade de Plantas dos Cerrados Piauienses

Ruth Raquel Soares de Farias
(Organizadora)



Atena
Editora
Ano 2020

2020 by Atena Editora

Copyright © Atena Editora

Copyright do Texto © 2020 Os autores

Copyright da Edição © 2020 Atena Editora

Editora Chefe: Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

Diagramação: Geraldo Alves

Edição de Arte: Lorena Prestes

Revisão: Os Autores



Todo o conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição *Creative Commons*. Atribuição 4.0 Internacional (CC BY 4.0).

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores. Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Conselho Editorial

Ciências Humanas e Sociais Aplicadas

Profª Drª Adriana Demite Stephani – Universidade Federal do Tocantins

Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Alexandre Jose Schumacher – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso

Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof. Dr. Antonio Gasparetto Júnior – Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais

Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília

Prof. Dr. Carlos Antonio de Souza Moraes – Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa

Profª Drª Cristina Gaio – Universidade de Lisboa

Profª Drª Denise Rocha – Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Deyvison de Lima Oliveira – Universidade Federal de Rondônia

Prof. Dr. Edvaldo Antunes de Farias – Universidade Estácio de Sá

Prof. Dr. Eloi Martins Senhora – Universidade Federal de Roraima

Prof. Dr. Fabiano Tadeu Grazioli – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões

Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionale delle Figlie di Maria Ausiliatrice

Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense

Profª Drª Keyla Christina Almeida Portela – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso

Profª Drª Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins

Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte

Prof. Dr. Marcelo Pereira da Silva – Universidade Federal do Maranhão

Profª Drª Miranilde Oliveira Neves – Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará

Profª Drª Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa

Profª Drª Rita de Cássia da Silva Oliveira – Universidade Estadual de Ponta Grossa

Profª Drª Sandra Regina Gardacho Pietrobon – Universidade Estadual do Centro-Oeste

Profª Drª Sheila Marta Carregosa Rocha – Universidade do Estado da Bahia

Prof. Dr. Rui Maia Diamantino – Universidade Salvador

Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará

Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande

Prof. Dr. William Cleber Domingues Silva – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

Ciências Agrárias e Multidisciplinar

Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano

Prof. Dr. Antonio Pasqualetto – Pontifícia Universidade Católica de Goiás

Profª Drª Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná

Profª Drª Diocléa Almeida Seabra Silva – Universidade Federal Rural da Amazônia
Prof. Dr. Écio Souza Diniz – Universidade Federal de Viçosa
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Fágner Cavalcante Patrocínio dos Santos – Universidade Federal do Ceará
Profª Drª Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Prof. Dr. Júlio César Ribeiro – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Profª Drª Lina Raquel Santos Araújo – Universidade Estadual do Ceará
Prof. Dr. Pedro Manuel Villa – Universidade Federal de Viçosa
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
Profª Drª Talita de Santos Matos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof. Dr. Tiago da Silva Teófilo – Universidade Federal Rural do Semi-Árido
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas

Ciências Biológicas e da Saúde

Prof. Dr. André Ribeiro da Silva – Universidade de Brasília
Profª Drª Anelise Levay Murari – Universidade Federal de Pelotas
Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás
Prof. Dr. Edson da Silva – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
Profª Drª Eleuza Rodrigues Machado – Faculdade Anhanguera de Brasília
Profª Drª Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina
Prof. Dr. Ferlando Lima Santos – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. Igor Luiz Vieira de Lima Santos – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Profª Drª Magnólia de Araújo Campos – Universidade Federal de Campina Grande
Profª Drª Mylena Andréa Oliveira Torres – Universidade Ceuma
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federaci do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Paulo Inada – Universidade Estadual de Maringá
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande

Ciências Exatas e da Terra e Engenharias

Prof. Dr. Adélio Alcino Sampaio Castro Machado – Universidade do Porto
Prof. Dr. Alexandre Leite dos Santos Silva – Universidade Federal do Piauí
Prof. Dr. Carlos Eduardo Sanches de Andrade – Universidade Federal de Goiás
Profª Drª Carmen Lúcia Voigt – Universidade Norte do Paraná
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará
Prof. Dr. Juliano Carlo Rufino de Freitas – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Marcelo Marques – Universidade Estadual de Maringá
Profª Drª Neiva Maria de Almeida – Universidade Federal da Paraíba
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista

Conselho Técnico Científico

Prof. Msc. Abrãao Carvalho Nogueira – Universidade Federal do Espírito Santo
Prof. Msc. Adalberto Zorzo – Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza
Prof. Dr. Adailson Wagner Sousa de Vasconcelos – Ordem dos Advogados do Brasil/Seccional Paraíba
Prof. Msc. André Flávio Gonçalves Silva – Universidade Federal do Maranhão
Profª Drª Andreza Lopes – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento Acadêmico
Profª Msc. Bianca Camargo Martins – UniCesumar
Prof. Msc. Carlos Antônio dos Santos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof. Msc. Cláudia de Araújo Marques – Faculdade de Música do Espírito Santo
Prof. Msc. Daniel da Silva Miranda – Universidade Federal do Pará
Profª Msc. Dayane de Melo Barros – Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Edwaldo Costa – Marinha do Brasil
 Prof. Msc. Eliel Constantino da Silva – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita
 Prof. Msc. Gevair Campos – Instituto Mineiro de Agropecuária
 Prof. Msc. Guilherme Renato Gomes – Universidade Norte do Paraná
 Prof^a Msc. Jaqueline Oliveira Rezende – Universidade Federal de Uberlândia
 Prof. Msc. José Messias Ribeiro Júnior – Instituto Federal de Educação Tecnológica de Pernambuco
 Prof. Msc. Leonardo Tullio – Universidade Estadual de Ponta Grossa
 Prof^a Msc. Lilian Coelho de Freitas – Instituto Federal do Pará
 Prof^a Msc. Liliani Aparecida Sereno Fontes de Medeiros – Consórcio CEDERJ
 Prof^a Dr^a Lívia do Carmo Silva – Universidade Federal de Goiás
 Prof. Msc. Luis Henrique Almeida Castro – Universidade Federal da Grande Dourados
 Prof. Msc. Luan Vinicius Bernardelli – Universidade Estadual de Maringá
 Prof. Msc. Rafael Henrique Silva – Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados
 Prof^a Msc. Renata Luciane Polsaque Young Blood – UniSecal
 Prof^a Msc. Solange Aparecida de Souza Monteiro – Instituto Federal de São Paulo
 Prof. Dr. Welleson Feitosa Gazel – Universidade Paulista

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)	
Q6	<p>Quimiodiversidade de plantas dos cerrados piauienses [recurso eletrônico] / Organizador Ruth Raquel Soares de Farias. – Ponta Grossa, PR: Atena, 2020.</p> <p>Formato: PDF Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader Modo de acesso: World Wide Web Inclui bibliografia ISBN 978-65-86002-34-8 DOI 10.22533/at.ed.348200503</p> <p>1. Plantas – Identificação – Piauí. I. Farias, Ruth Raquel Soares de.</p> <p style="text-align: right;">CDD 577.098122</p>
Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422	

Atena Editora
 Ponta Grossa – Paraná - Brasil
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br

APRESENTAÇÃO

“[...] Animais agem, plantas produzem.”

Swain (1974)

A biodiversidade brasileira é vista nacional e mundialmente como uma moeda de poder e riqueza, mas isso é preocupante para aqueles que pensam na preservação e devido esta inquietude, os pesquisadores envolvidos com esta publicação buscaram por meio dos estudos químicos e biológicos até então conhecidos, valorizar os Cerrados Piauienses por intermédio de algumas de suas espécies de relevância.

As espécies de Combretaceae são de interesse ímpar devido ao histórico de potencialidades farmacológicas, já conhecido, em especial dos gêneros *Combretum* Loefl. e *Terminalia* L. O presente trabalho teve como objetivo investigar a quimiodiversidade e o possível potencial biológico dos extratos das folhas de *Combretum duarteanum* Cambess, *C. mellifluum* Eichler e *Terminalia actinophylla* Mart. coletadas nos Cerrados Setentrional e Meridional do estado do Piauí, principalmente por conta das suas amplas e significativas distribuições geográficas.

Considerando que os metabólitos secundários de plantas são ferramentas valiosas para a compreensão da biossíntese e desenvolvimento de novos fármacos e, em face das atividades descritas para plantas da família Combretaceae, faz-se necessário o seu estudo fitoquímico nos Cerrados do Piauí, procurando fornecer dados que contribuam para a amplitude fitogeográfica daquelas espécies, vantajosa ou não, além de atualizar suas performances quanto ao caráter se dominantes, intermediárias ou raras em termos de padrões de abundância e evidenciar características fitoquímicas importantes para o conhecimento associado.

As espécies estão distribuídas nos Cerrados Setentrional (norte) e Meridional (sul), mas de forma espaçadas, em áreas devolutas (áreas não preservadas). *Combretum duarteanum* e *C. mellifluum*, por serem espécies de pequeno porte, arbustivas, frequentemente sofrem com ações antrópicas (desmatamentos, queimadas etc.) e *Terminalia actinophylla*, embora apresente um porte arbóreo frondoso, simplesmente é valorizada pela qualidade de sua madeira, passando por um constante processo de desbaste para utilização em construção civil.

Outras espécies dos cerrados piauienses e outras escalas de distribuição precisam dar continuidade, fortalecendo, ou não, nossa hipótese de partida, que além de inédita e, apoiada por este trabalho, chama a atenção sobre o fato de que as condições abióticas influenciam, podendo até mascarar, os resultados fitoquímicos que se quer pesquisar, ou, erradamente, sustentar alguma ‘falta de importância

econômica e social, dependendo da distribuição geográfica de alguma espécie da flora dos cerrados piauienses.

Após a divulgação desses estudos, espera-se de um lado que um maior número de ensaios sejam desenvolvidos tanto em *in vitro* como *in vivo*, que os mesmos contribuam para a descoberta de novas substâncias biologicamente ativas favorecendo P&D&I, fornecendo subsídios para o desenvolvimento de pesquisas na perspectiva de cada vez mais agregar valor à biodiversidade por meio do conhecimento químico para uma utilização sustentável dessas plantas e que os cerrados marginais e ecótonos associados sejam cada vez mais valorizados, por biólogos, químicos etc..

Ruth Raquel Soares de Farias
Antonio Alberto Jorge Farias Castro

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
QUIMIODIVERSIDADE COMPARATIVA E POTENCIAL BIOLÓGICO DE <i>Combretum duarteianum</i> CAMBESS. EM DUAS REGIÕES DO CERRADO PIAUIENSE	
Ruth Raquel Soares de Farias	
Erika Thalyta Veras Pereira	
Mariana Helena Chaves	
Paulo Michel Pinheiro Ferreira	
Chistiane Mendes Feitosa	
Claudia do Ó Pessoa	
George Laylson da Silva Oliveira	
Rusbene Bruno Fonseca de Carvalho	
Jéssica Pereira Costa	
Antonio Alberto Jorge Farias Castro	
Samara Raquel de Sousa	
DOI 10.22533/at.ed.3482005031	
CAPÍTULO 2	19
PERFIL FITOQUÍMICO DE ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DE <i>Combretum mellifluum</i> EICHLER DE DUAS ÁREAS DE CERRADO	
Ruth Raquel Soares de Farias	
Erika Thalyta Veras Pereira	
Mariana Helena Chaves	
Paulo Michel Pinheiro Ferreira	
Chistiane Mendes Feitosa	
Claudia do Ó Pessoa	
George Laylson da Silva Oliveira	
Rusbene Bruno Fonseca de Carvalho	
Jéssica Pereira Costa	
Antonio Alberto Jorge Farias Castro	
Samara Raquel de Sousa	
DOI 10.22533/at.ed.3482005032	
CAPÍTULO 3	38
ANÁLISE COMPARATIVA DE EXTRATOS DAS FOLHAS DE <i>Terminalia actinophylla</i> MART. DE DUAS ÁREAS DE CERRADO: POTENCIAL FARMACOLÓGICO	
Ruth Raquel Soares de Farias	
Erika Thalyta Veras Pereira	
Mariana Helena Chaves	
Paulo Michel Pinheiro Ferreira	
Chistiane Mendes Feitosa	
Claudia do Ó Pessoa	
George Laylson da Silva Oliveira	
Rusbene Bruno Fonseca de Carvalho	
Jéssica Pereira Costa	
Antonio Alberto Jorge Farias Castro	
Márcia Denise Alves Veras	
Carlos Humberto Aires Matos Filho	
DOI 10.22533/at.ed.3482005033	
SOBRE A ORGANIZADORA.....	59
ÍNDICE REMISSIVO	60

Capítulo 1

QUIMIODIVERSIDADE COMPARATIVA E POTENCIAL BIOLÓGICO DE *Combretum duarteanum* CAMBESS. EM DUAS REGIÕES DO CERRADO PIAUIENSE



QUIMIODIVERSIDADE COMPARATIVA E POTENCIAL BIOLÓGICO DE *Combretum duarteanum* CAMBESS. EM DUAS REGIÕES DO CERRADO PIAUIENSE

Data de aceite: 02/12/2019

Ruth Raquel Soares de Farias

Faculdade de Ensino Superior do Piauí - FAESPI
Teresina-PI

Erika Thalyta Veras Pereira

Universidade Federal de São Carlos -UFSCar São
Carlos-SP

Mariana Helena Chaves

Universidade Federal do Piauí, UFPI Teresina-PI

Paulo Michel Pinheiro Ferreira

Universidade Federal do Piauí, UFPI Teresina-PI

Chistiane Mendes Feitosa

Universidade Federal do Piauí, UFPI Teresina-PI

Claudia do Ó Pessoa

Universidade Federal do Ceará, UFC Fortaleza-
CE

George Laylson da Silva Oliveira

Instituto Federal de Educação Ciência e
Tecnologia de Mato Grosso, IFMT, Brasil

Rusbene Bruno Fonseca de Carvalho

Universidade Federal do Piauí, UFPI Teresina-PI

Jéssica Pereira Costa

Universidade Federal do Piauí, UFPI Teresina-PI

Antonio Alberto Jorge Farias Castro

Universidade Federal do Piauí, UFPI Teresina-PI

Samara Raquel de Sousa

Universidade Federal do Piauí, UFPI Teresina-PI
BioTEN

RESUMO: A espécie *Combretum duarteanum* Cambess. é de relevante interesse devido ao histórico de potencialidades farmacológicas, já conhecida na família Combretaceae e no gênero *Combretum*. O presente trabalho teve como objetivo investigar a quimiodiversidade e o potencial biológico dos extratos hexânico, etanólico e aquoso das folhas de *C. duarteanum* coletadas no Cerrado Setentrional e Meridional do estado do Piauí. O perfil químico dos extratos foi obtido por cromatografia líquida de alta eficiência. A atividade antioxidante foi avaliada pelos ensaios dos radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH), hidroxila e óxido nítrico, substâncias reagentes ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e redução do íon Fe^{3+} à Fe^{2+} . A determinação do teor de fenóis totais foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu e de flavonoides totais por redução com cloreto de alumínio. A atividade anticolinesterásica foi investigada pelo método de Ellman e citotoxicidade pelo método de brometo de 3-(4,5dimetildiazol-2-il)-2,5difeniltretrazolium (MTT), frente as linhagens de células tumorais humanas (cólon, ovário e glioblastoma). O extrato aquoso de *C. duarteanum* do Cerrado Setentrional apresentou o maior potencial antioxidante nos ensaios testados. Os extratos etanólicos de *C. duarteanum* do Cerrado Setentrional e Meridional apresentaram atividade citotóxica frente as três linhagens.

Todos os extratos de *C. duarteanum* do Cerrado Setentrional e o extrato etanólico de *C. duarteanum* do Cerrado Meridional demonstraram atividade anticolinesterásica. Os ensaios realizados demonstram que há uma diferença no perfil químico e biológico dos espécimes, sugerindo que as relações ecológicas devem ser levadas em consideração em estudos químico/farmacológico.

PALAVRAS-CHAVE: Atividade antioxidante. Atividade anticolinesterásica. Atividade citotóxica. Fitogeografia. Fitoquímica.

COMPARATIVE CHEMODIVERSITY AND BIOLOGICAL POTENTIAL OF *Combretum duarteanum* CAMBESS. FROM TWO REGIONS OF CERRADO OF PIAUÍ STATE

ABSTRACT: The species *Combretum duarteanum* Cambess. is of relevant interest due to its history of pharmacological potential, already known in the family Combretaceae and in the genus *Combretum*. This study aimed to investigate the chemodiversity and the biological potential of hexane, ethanolic and aqueous extracts of the leaves of *C. duarteanum* collected in the northern and southern cerrados at the state of Piauí. The chemical profile of the extracts was obtained by high-performance liquid chromatography (HPLC). The antioxidant activity was evaluated by the test of the radicals 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), hydroxyl and nitric oxide, reactive substances to thiobarbituric acid (TBARS), and reduction of Fe^{3+} to Fe^{2+} . The determination of total phenolic and flavonoid content was performed by the method of Folin-Ciocalteu and by reduction with aluminum chloride, respectively. The anticholinesterase activity was performed by Ellman's method. The cytotoxicity activity was tested by MTT assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difentretazolium) against human tumor cell lines (colon, ovary and glioblastoma). The aqueous extract of *C. duarteanum* from northern cerrado presented the highest antioxidant potential in the test trials. The ethanol extracts of *C. duarteanum* from northern and southern cerrado exhibited cytotoxic activity against the three cell lines. All extracts of *C. duarteanum* from northern cerrado and the ethanol extract of *C. duarteanum* from southern cerrado showed acetylcholinesterase activity. The tests demonstrated that there is a difference in the chemical and biological potential among the species studied. This may suggest that the ecological relationships should be taken into consideration in chemical and pharmacological studies.

KEYWORDS: Antioxidant Activity. Anticholinesterase Activity. Cytotoxic Activity. Phytochemistry. Phytochemistry.

1 | INTRODUÇÃO

Os cerrados do Piauí distribuem-se entre as latitudes de 03°58' a 08°51" S, longitudes 41°43' a 04°15" W e altitudes de 70 a 430 m.n.m. Na região norte do Estado, encontram-se os Cerrados Setentrionais e, na região sul, os Cerrados Meridionais, denominados assim por Castro et al. (2010).

Combretaceae e *Combretum* têm ampla distribuição geográfica tanto nos Cerrados Setentrional como no Meridional, inclusive em termos de representação

populacional (FARIAS et al., 2014).

É importante destacar que as espécies do gênero *Combretum* Loefl. possuem diversas atividades biológicas comprovadas, como: atividade anticolinesterásica para *Combretum hartmannianum* Schweinf. (ELDEEN; VAS STADEN, 2007), antioxidante para *C. decandrum* Jacq. (PANNANGPETCH; TAEJARERNWIRIYAKUL; KONGYINGYONES, 2008) e citotóxica para as espécies *C. apiculatum* Sond., *C. fragrans* F. Hoffm., *C. hereroense* Schinz, *C. padoides*, Engl. & Diels, *C. psidioides* Welw., *C. zeyheri* Sond., *C. collinum* Fresen. (FYHRQUIST et al., 2006) e *C. comosum* G. Don. (LAMIDI et al., 2005).

Com isso as potencialidades farmacológicas já conhecidas para Combretaceae e *Combretum*, associadas às características ecológicas peculiares do estado do Piauí e à ampla distribuição geográfica da espécie *Combretum duarteanum* Cambess., inclusive, em áreas de transição, suportam a ideia de quimiodiversidade.

Na medicina popular *C. duarteanum* é utilizada como expectorante (ALBUQUERQUE et al., 2007) e no tratamento de dor e como sedativo (GOUVEIA et al., 2011). Estudos relatam que o extrato etanólico das folhas desta espécie *C. duarteanum* possui atividade antinociceptiva (QUINTANS et al., 2014), antioxidante, anti-inflamatória (GOUVEIA et al., 2011), gastroprotetora (LIMA et al., 2013) e antimicrobiana (NASCIMENTO; CHIAPPETA; LIMA, 1990) e a fração hexânica do extrato etanólico das folhas possui atividade antinociceptiva (QUINTANS et al., 2014) e gastroprotetora (LIMA et al., 2013).

Diante do exposto o objetivo do estudo foi investigar a quimiodiversidade e o potencial biológico dos extratos hexânico, etanólico e aquoso das folhas de *C. duarteanum* coletadas em áreas de Cerrado Setentrional e Meridional do estado do Piauí.

2 | MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material Vegetal

O material vegetal utilizado foram folhas de *Combretum duarteanum* Cambess., coletadas no estado do Piauí, Brasil, em janeiro de 2012 nos municípios de Jatobá do Piauí (área de Cerrado Setentrional), nas coordenadas 04° 51' 48.5" S, 42° 04' 21.0" W e 90 m.n.m. e de Floriano (área Cerrado Meridional), nas coordenadas 07° 04' 34.3" S, 43° 08' 46.2" W e 198 m.n.m. Os exemplares testemunhos (vouchers) foram incorporados ao acervo do Herbário Graziela Barroso (TEPB) da Universidade Federal do Piauí, sob os números TEPB 27.960 e TEPB 30.118, respectivamente. A determinação botânica ao nível de espécie foi realizada pela Dra. Maria Iracema Bezerra Loiola da Universidade Federal do Ceará - UFC, especialista na Família Combretaceae.

2.2 Preparação dos extratos

As folhas foram desidratadas à temperatura ambiente em local arejado, em seguida moídas, em moinho de facas e submetidas ao procedimento de extração por maceração por três vezes, com hexano, etanol e água sucessivamente. Cada extração teve a duração de 72 horas. Após o solvente ser removido por destilação em rotaevaporador, a água residual foi removida por liofilização. Foram obtidos os seguintes extratos: Extrato hexânico de *Combretum duarteanum* do cerrado Setentrional (EHCduaS 19,76 g; 2,30%), Extrato etanólico de *C. duarteanum* do cerrado Setentrional (EECduaS 72,05 g; 8,40%), Extrato aquoso de *C. duarteanum* do cerrado Setentrional (EACduaS 49,30 g; 4,93%), Extrato hexânico de *Combretum duarteanum* do cerrado Meridional (EHCduaM 3,71 g; 0,43%), Extrato etanólico de *C. duarteanum* do cerrado Meridional EECduaM (44,04 g; 5,15%), Extrato aquoso de *C. duarteanum* do cerrado Meridional EACduaM (49,44 g; 5,78%).

2.3 Atividade antioxidante pelo ensaio de DPPH

A atividade antioxidante (AA) foi realizada pelo ensaio do radical DPPH[•] como descrito por Sousa et al. (2007), em triplicata, tendo como controle positivo a Rutina. As amostras foram realizadas nas concentrações de 25, 50, 100, 150, 200 e 250 µg/mL, no comprimento de onda de 516 nm. Os valores da AA foram expressos em porcentagem de atividade antioxidante. A concentração eficiente capaz de reduzir em 50% o DPPH[•], foi calculada com o auxílio do programa *IBM SPSS Statistic 20*, por meio de uma curva exponencial de primeira ordem, obtida plotando-se no eixo x as concentrações da amostra (µg/mL) e no eixo y, a porcentagem de atividade antioxidante.

2.4 Determinação do nível de peroxidação lipídica (TBARS)

A atividade antioxidante *in vitro* por substâncias reagentes ao ácido tiobarbitúrico método de TBARS foi avaliada como descrita por Silva et al. (2007). As amostras foram analisadas nas concentrações 0,9; 1,8; 3,6; 5,4 e 7,2 µg/mL. O veículo (tween 80 a 0,05%, dissolvido em salina 0,9%), foi utilizado como controle negativo e o Trolox, nas mesmas concentrações da amostra, como controle positivo. As absorbâncias foram lidas à 532 nm em um espectrofotômetro UV-Vis e os resultados expressos como porcentagem de TBARS formada a partir do AAPH (controle induzido).

2.5 Determinação do nível de inibição da produção do radical hidroxila

A atividade antioxidante no ensaio do radical hidroxila (OH[•]) foi avaliada a partir da reação de Feton como descrito na metodologia de Lopes, Schulman e Hermes-Lima (1999). O método consiste em quantificar o malondialdeído, produto

da degradação oxidativa do açúcar 2-desoxiribose, por sua condensação com o ácido tiobarbitúrico. As amostras foram analisadas nas concentrações 0,9; 1,8; 3,6; 5,4 e 7,2 $\mu\text{g/mL}$ e as absorbâncias foram medidas à 532 nm. O Trolox, nas mesmas concentrações da amostra, foi utilizado como controle positivo. Os resultados foram expressos como equivalentes do malondialdeído formado por Fe^{2+} e H_2O_2 .

2.6 Determinação do potencial sequestrador do radical óxido nítrico

A quantificação do óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) produzido foi realizada a partir da decomposição espontânea do nitroprussiato de sódio (NPS) em tampão fosfato 20 mM (pH 7,4) de acordo com a metodologia descrita por Nogueira Neto, Sousa e Freitas (2013) utilizando reagente de Griess (GREEN et al., 1982). As amostras foram analisadas nas concentrações de 0,9; 1,8; 3,6; 5,4 e 7,2 $\mu\text{g/mL}$. A absorbância do cromóforo foi medida a 540 nm. A percentagem de inibição do óxido nítrico gerado foi medida por meio da comparação dos valores de absorbância do controle negativo (NPS 10 mM e veículo) e das amostras. O Trolox, nas mesmas concentrações da amostra, foi utilizado como controle positivo. Os resultados foram expressos em percentagem de nitrito formado por NPS isoladamente.

2.7 Avaliação do potencial redutor

O potencial redutor dos extratos foi avaliado pela redução direta do ferricianeto de potássio (III) [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$] à ferrocianeto de potássio (II) [$\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$], conforme metodologia descrita por Singhal, Paul e Singh (2014), com algumas modificações. As amostras foram testadas nas concentrações de 0,9; 1,8; 3,6; 5,4 e 7,2 $\mu\text{g/mL}$, com 1 mL de ferrocianeto de potássio 1% e 1 mL de tampão fosfato de sódio (0,2 M, pH 6,6). A mistura reacional foi incubada a 50°C durante 20 minutos, e em seguida adicionou-se 1 mL de ácido tricloroacético 10%. A mistura resultante foi centrifugada a 3000 rpm durante 10 minutos. Ao sobrenadante da mistura reacional foi acrescentado 1 mL de água destilada e 0,5 mL de cloreto férrico (FeCl_3) 0,1%. As absorbâncias foram medidas a 700 nm contra o branco que continha apenas tampão fosfato. O mesmo procedimento experimental foi utilizado com o controle positivo Trolox.

2.8 Teor de fenóis totais

O teor de fenóis totais foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu de acordo com Sousa et al. (2007). As medidas de absorbância das soluções (1 $\mu\text{g/mL}$) foram medidas no comprimento de onda de 750 nm. O resultado foi definido pela interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico e expressa por $A = 0,1185c - 0,0453$, com

coeficiente de correlação linear igual a 0,999, em que “*c*” é a concentração do ácido gálico e “*A*” é absorvância. O resultado é apresentado em miligramas de equivalente de ácido gálico por grama de extrato (mg de EAG/g).

2.9 Determinação do teor de flavonoides totais

O teor de flavonoides totais foi determinado conforme Peixoto Sobrinho et al. (2010) e Ferreira et al. (2014). As medidas de absorvâncias das soluções das amostras (1 µg/mL) foram feitas no comprimento de onda de 420 nm. O resultado foi calculado por interpolação da absorvância das amostras contra uma curva de calibração construída com o padrão rutina. A curva de calibração é expressa por $A = 0,02618c - 0,00717$, em que “*A*” é a absorvância da amostra e “*c*” a concentração da rutina, com um coeficiente de correlação linear igual a 0,999. O resultado foi expresso em miligrama de equivalente de rutina (mg ER/g de extrato).

2.10 Atividade anticolinesterásica

A detecção do poder de inibição qualitativa da enzima acetilcolinesterase foi verificada pelo teste de Ellman et al. (1961), modificado por Rhee et al. (2001). Alíquotas de 1,5-2,5 µL das soluções metanólicas das amostras (10 mg/mL) foram aplicadas em placa gel de sílica e eluída em clorofórmio/metanol 9:1. A placa foi revelada com reagente de Ellman sendo borrifada com DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico])/ATCI (Iodeto de acetiltiocolina) (1 mM DTNB e 1 mM ATCI em tampão) até a saturação. Após um repouso de 3 a 5 minutos, para que a placa secasse, 5 units/mL da enzima acetilcolinesterase foi borrifada sobre a placa. Aguardou-se aproximadamente 5 minutos para a observação dos resultados. A resposta positiva do teste foi a observação de manchas brancas semelhantes ao padrão, cafeína.

2.11 Atividade citotóxica

A avaliação da citotoxicidade foi realizada a partir do método brometo de 3-(4,5dimetildiazol-2-il)-2,5difeniltretrazolium (MTT) descrito por Mosmann (1983) seguindo Almeida et al. (2014), com o controle positivo dexorubicina. Para a análise foi utilizado as linhagens de células tumorais humanas HCT-116 (colorretal), OVCAR-8 (ovário) e SF-295 (glioblastoma), cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA) e cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂. As amostras foram diluídas em DMSO PA estéril. Os extratos foram testados na concentração de 50 µg/mL. As linhagens celulares utilizadas foram plaqueadas nas concentrações de 0,1 x 10⁶ células/mL (HCT-116 e OVCAR-8) e 0,7 x 10⁵ células/mL (SF-295). A absorvância foi medida em espectrofotômetro de placa

a um comprimento de onda de 595 nm.

2.12 Análise estatística

As análises foram realizadas utilizando os programas *Microcal Origin 8.0*, ou *IBM SPSS Statistic 20* para o cálculo das CE_{50} . A comparação estatística dos resultados obtidos foi realizada aplicando-se ANOVA e comparações múltiplas pelo teste de Tukey ($p < 0,01$ e $p < 0,05$). Todos os testes foram realizados em triplicata.

2.13 Cromatografia líquida de alta eficiência

Os perfis cromatográficos dos extratos foram obtidos por meio de análise em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em escala analítica, com equipamento *Shimadzu Prominence System* com sistema binário de bombas LC-6AD, detector UV SPD-20A e injetor manual. A coluna utilizada foi a C18 Shim-pack CLCods(M) de 250 x 4,6 mm e partícula de 5 μ m. As amostras analisadas foram submetidas a um tratamento, utilizando membrana filtrante de 0,45 μ m. A eluição foi realizada com MeOH/H₂O, em modo gradiente modo (5 \rightarrow 100% em 60 min), em vazão de 1,0 mL/min, a temperatura ambiente (25 °C) e uma injeção de 20 μ L de solução do extrato em uma concentração de 5,0 mg/mL. Os cromatogramas foram monitorados a 254 nm.

2.14 Análise multivariada

A análise multivariada foi aplicada sobre a tabela contendo os resultados dos ensaios antioxidantes e das atividades biológicas estudadas, devido às diferentes escalas de grandeza das variáveis, os dados foram centrados na média e escalonados segundo os seus respectivos desvios padrão.

A Análise de Componentes Principais (*Principal Components Analysis - PCA*) foi realizada com 6 Componentes Principais (*Principal Components - PC*), peso 1 para todas as variáveis e amostras, validação cruzada com uma amostra por segmento e sem rotação, o programa Unscrambler® X 10.2 (Camo, Noruega) foi utilizado para a realização da análise multivariada e o programa Excel foi utilizado para a construção das tabelas. Nenhuma amostra ou variável foi considerada discrepante.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato etanólico de *Combretum duarleanum* do Cerrado Setentrional (EECduaS) apresentou o maior rendimento (8,4%). Os extratos hexânico e aquoso de maior rendimento foram para o *C. duarleanum* do Cerrado Meridional, com 3,71% e 5,78% respectivamente.

3.1 Atividade antioxidante

No ensaio de DPPH a espécie *C. duarteanum* coletada no Cerrado Setentrional é mais ativa que a coletada no Cerrado Meridional, como pode ser observado pelos valores de CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$), uma vez que quanto menor a CE_{50} , maior a atividade antioxidante (Tabela 1). Esta distinção pode ser atribuída à diferença de concentração e/ou de substâncias antioxidantes.

Dentre os extratos testados o aquoso de *C. duarteanum* do Cerrado Setentrional (EACduaS) exibiu a maior atividade antioxidante ($CE_{50} = 68,98 \pm 0,65 \mu\text{g/mL}$), contudo inferior ao controle positivo, rutina, ($CE_{50} = 47,08 \pm 4,65 \mu\text{g/mL}$). Para os EHCduaS, EHCduaM e EECduaM não foi possível calcular a CE_{50} , pois a maior concentração testada ($250 \mu\text{g/mL}$) não foi capaz de reduzir os radicais DPPH em 50%.

No ensaio de inibição do radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$) na ordem de atividade antioxidante observada foi EACduaS > EECduaS > EHCduaM > EACduaM > EECduaM > EHCduaS. A maior atividade antioxidante foi verificada para o EACduaS ($CE_{50} = 1,58 \mu\text{g/mL}$), porém é menor quando comparado do controle positivo ($CE_{50} = 0,76 \mu\text{g/mL}$). A comparação entre os valores de CE_{50} para o extrato da espécie coletada nos dois cerrados indica que as amostras possuem potencial antioxidante significativamente diferentes.

Na avaliação da atividade sequestradora do radical óxido nítrico, os extratos etanólico (EECduaS $CE_{50} = 5,04 \mu\text{g/mL}$) e aquoso (EACduaS $CE_{50} = 1,94 \mu\text{g/mL}$) foram os mais ativos, sendo que EACduaS apresentou maior atividade sequestradora que o controle positivo (trolox, $CE_{50} = 3,23 \mu\text{g/mL}$). Os extratos de *C. duarteanum* do Cerrado Setentrional apresentaram maior potencial antioxidante que os extratos de *C. duarteanum* do Cerrado Meridional.

A ordem de atividade antioxidante no ensaio TBARS foi EACduaS > EECduaS > EACduaM > EECduaM > EHCduaM > EHCduaS. O EECduaS ($CE_{50} = 4,52 \mu\text{g/mL}$) e EACduaS ($CE_{50} = 2,10 \mu\text{g/mL}$) exibiram os maiores potenciais antioxidantes, porém menor que o observado para o Trolox ($CE_{50} = 0,23 \mu\text{g/mL}$). Gouveia et al. (2011) relataram atividade antioxidante pelo ensaio TBARS, para as folhas de *C. duarteanum* coletada em uma região da caatinga (Serra Branca-PB, Brasil), sendo que os percentuais de AA foram menores que do controle, trolox, em concordância com os obtidos para a espécie das duas regiões de cerrado do Piauí.

Para o ensaio de redução do ferricianeto de potássio à ferrocianeto de potássio os EECduaS ($CE_{50} = 0,49 \mu\text{g/mL}$) e EACduaS ($CE_{50} = 1,50 \mu\text{g/mL}$) apresentaram potencial antioxidante maior que o controle positivo ($CE_{50} = 2,13 \mu\text{g/mL}$). Observou-se uma acentuada diferença entre os extratos de *C. duarteanum* do Cerrado Meridional e Setentrional, sobretudo para o aquoso, uma vez que a CE_{50} do EACduaM foi $167,27 \mu\text{g/mL}$ enquanto que a de EACduaS foi $1,5 \mu\text{g/mL}$. Os resultados obtidos mostram

que a espécie *C. duarteanum* coletada no Cerrado Setentrional é mais ativa que a coletada no Cerrado Meridional, exceto para os extratos hexânicos.

Extrato/ Ensaio antioxidante	DPPH	Hidroxila	Oxido nítrico	TBARS	Fe ³⁺ /Fe ²⁺
EHCduaS	ND	19,55	9,46	19,04	43,13
EECduaS	267,541	5,24	5,04	4,52	0,49
EACduaS	68,98	1,58	1,94	2,10	1,50
EHCduaM	ND	16,08	15,51	13,01	6,26
EECduaM	ND	17,82	19,15	9,67	4,89
EACduaM	160,93	17,51	19,15	7,82	167,27
Rutina	47,08	-	-	-	-
Trolox		0,76	3,23	0,23	2,13

Tabela 1 – Atividade antioxidante (CE₅₀, µg/mL) dos extratos hexânicos, etanólicos e aquosos de *Combretum duarteanum* do Cerrado Setentrional e Meridional do estado do Piauí

EHCduaS: Extrato hexânico de *Combretum duarteanum* do Cerrado Setentrional; EECduaS: Extrato etanólico de *C. duarteanum* do Cerrado Setentrional; EACduaS: Extrato aquoso de *C. duarteanum* do Cerrado Setentrional; EHCduaM: Extrato hexânico de *Combretum duarteanum* do Cerrado Meridional; EECduaM: Extrato etanólico de *C. duarteanum* do Cerrado Meridional; EACduaM: Extrato aquoso de *C. duarteanum* do Cerrado Meridional; TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; ND: não determinada.

3.2 Teor de fenóis e flavonoides totais

O EECduaS (117,61±0,97 mg EAG/g) apresentou maior teor do que EECduaM (88,69±0,25 mg EAG/g), o mesmo acontece para o EACduaS (243,35±4,71 mg EAG/g) e EACduaM (221,04±5,95 mg EAG/g) (Tabela 2).

Os maiores teores de fenóis totais foram para os extratos de *C. duarteanum* do Cerrado Setentrional, demonstrando uma correlação positiva com a atividade antioxidante nos ensaios com os radicais de DPPH, hidroxila, óxido nítrico e frente a TBARS. Este comportamento é esperado, pois os compostos fenólicos são potenciais sequestradores de radicais livres, portanto antioxidantes (FERREIRA et al., 2014).

Os teores de flavonoides totais (FLAT) nos extratos hexânicos foram os mais altos (Tabela 2). Este comportamento é atípico, uma vez que os extratos hexânicos geralmente são constituídos por substâncias alifáticas de baixa polaridade, dentre estas os carotenoides, que absorvem no mesmo comprimento de onda do teste realizado (420 nm) sendo assim um interferente.

Extrato	FT mg de EAG/g Extrato	FLAT mg de ER/g Extrato
EHCduaS	70,58±0,46	267,24±0,95
EECduaS	117,61±0,97	164,84±4,21
EACduaS	243,35±4,71	67,95±0,89
EHCduaM	70,47±1,43	262,18±2,10

EECduaM	88,69±0,25	254,14±4,14
EACduaM	221,04±5,95	34,59±0,64

Tabela 2 – Teores de fenóis totais (FT), flavonoides totais (FLAT) dos extratos hexânicos, etanólicos e aquosos de *C. duarteanum* dos Cerrados Setentrional e Meridional

FLAT: Flavonoides totais; EAG: Equivalente de ácido gálico; ER: Equivalente de rutina; EHCduaS: Extrato hexânico de *Combretum duarteanum* do Cerrado Setentrional; EECduaS: Extrato etanólico de *C. duarteanum* do Cerrado Setentrional; EACduaS: Extrato aquoso de *C. duarteanum* do Cerrado Setentrional; EHCduaM: Extrato hexânico de *Combretum duarteanum* do Cerrado Meridional; EECduaM: Extrato etanólico de *C. duarteanum* do Cerrado Meridional; EACduaM: Extrato aquoso de *C. duarteanum* do Cerrado Meridional.

Excluindo os extratos hexânicos, os maiores teores de FLAT foram dos extratos etanólicos, sendo que EECduaM (254,14±4,14) foi maior que EECduaS (164,84±4,21). Estes resultados não apresentam correlação positiva com a atividade antioxidante, visto que EECduaS é sempre mais o ativo nos ensaios antioxidantes. No entanto, os teores de flavonoides totais possuem correlação com a altitude em que as espécies foram coletadas. O EECduaM (198 m.n.m) está em uma altitude maior que o EECduaS (90m.n.m), estudos relatam que quanto maior a altitude maior a produção de flavonoides (POLLE; DENNENBERG, 1992; ZIDORN; STUPPNER, 2001).

Isso é decorrente desta classe de substâncias, que são conhecidas por sua proteção aos raios UV-B, o que confere uma defesa às plantas.

Os baixos teores de flavonoides totais para os EACduaS (67,95±0,89 mg de ER/g) e EACduaM (34,59±0,64 mg de ER/g), sugerem que os potenciais antioxidantes observados para estes extratos são decorrentes de outra classe de substâncias fenólicas, como cumarinas, estilbenos, ácidos fenólicos dentre outras já descritas no gênero *Combretum* Loeft. (DAWE et al., 2013).

3.3 Atividade anticolinesterásica

Os extratos hexânico (EHCduaS), etanólico (EECduaS) e aquoso (EACduaS) de *Combretum duarteanum* do Cerrado Setentrional apresentaram indicativo de resultado positivo na inibição da enzima acetilcolinesterase. O mesmo não foi observado nos extratos de *C. duarteanum* do Cerrado Meridional, onde apenas o extrato etanólico (EECduaM) mostrou atividade. Isto sugere que *C. duarteanum* do Cerrado Setentrional possui substâncias anticolinesterásicas tanto de caráter polar como apolar, enquanto que a do Cerrado Meridional possui substâncias apenas de caráter polar.

A atividade anticolinesterásica já foi observada no gênero *Combretum* Loeft. por Eldeen e Vas Staden (2007) no extrato etanólico das folhas, cascas e raízes e extrato diclorometano da raiz da espécie *C. hartmannianum* Schweinf.. Os autores sugerem que a atividade pode ser decorrente de dois alcaloides frequentemente encontrados no gênero *Combretum*, a Combrestatinina A e B (combretines A e B), os

alcaloídes são conhecidos por possuírem atividade anticolinesterásica.

3.4 Atividade citotóxica

Todos os extratos estudados de *C. duarteanum* do Cerrado Meridional, apresentaram percentuais de atividade citotóxica mais altos quando comparados com os extratos de *C. duarteanum* do Cerrado Setentrional (Tabela 3).

Os dois extratos etanólicos (EECduaS e EECduaM) apresentaram elevado potencial citotóxico, acima de 75%, frente às três linhagens de células tumorais testadas. Para a linhagem SF-295 os extratos etanólicos apresentaram potencial citotóxico mais elevado que o controle positivo, Doxorrubucina. Estes valores reforçam o potencial citotóxico de espécies do gênero *Combretum*, relatado por Fyhrquist et al. (2006) e Lamidi et al. (2005).

Aplicando-se ANOVA e teste de Tukey observou-se uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre os extratos EECduaS (73,32%) e EECduaM (94,48%) frente à linhagem OVCAR-8 e entre EECduaS (95,87%) e EECduaM (100,63%) frente a linhagem HCT-116. Os extratos hexânicos (EHCduaS e EHCduaM) e aquosos (EACduaS e EACduaM) não mostraram atividade citotóxica frente a nenhuma das linhagens celulares testadas.

Extrato/ linhagem	HCT-116	OVCAR-8	SF-295
EHCduaS	0,66±1,09	-5,21±5,26	6,47±2,10
EECduaS	95,87±3,67*	73,32±11,60*	95,46±5,45*
EACduaS	-2,61±2,11	12,60±6,14	27,50±1,79
EHCduaM	49,57±3,46	38,64±16,37	42,66±1,86
EECduaM	100,63±0,51*	94,48±2,89*	97,11±0,25*
EACduaM	26,09±9,88	52,18±6,85	52,30±3,35
Doxorrubucina	96,80±4,60	100,0±0,70	83,60±3,00

Tabela 3 – Porcentagem da atividade citotóxica dos extratos hexânicos, etanólicos e aquosos de *C. duarteanum* do Cerrado Setentrional e Meridional frente a três linhagens celulares

EHCduaS: Extrato hexânico de *Combretum duarteanum* do Cerrado Setentrional; EECduaS: Extrato etanólico de *C. duarteanum* do Cerrado Setentrional; EACduaS: Extrato aquoso de *C. duarteanum* do Cerrado Setentrional; EHCduaM: Extrato hexânico de *Combretum duarteanum* do Cerrado Meridional; EECduaM: Extrato etanólico de *C. duarteanum* do Cerrado Meridional; EACduaM: Extrato aquoso de *C. duarteanum* do Cerrado Meridional. Linhagens celulares HCT-116 (colorretal humano), OVCAR-8 (ovário humano) e SF-295 (glioblastoma humano).

3.5 Perfis cromatográficos

A similaridade entre os perfis cromatográficos obtidos para *C. duarteanum* nas duas diferentes regiões do cerrado, foi avaliada por meio da comparação dos tempos de retenção e intensidade dos sinais cromatográficos, obtidos de 254 nm, conforme apresentado nas Figuras 1 e 2.

A partir dos perfis cromatográficos é possível observar a similaridade química entre *C. duarteanum* do cerrado Setentrional e *C. duarteanum* do cerrado Meridional, o que é esperado tratando-se da mesma espécie.

Considerando as seis bandas majoritárias nos extratos etanólicos (Figura 1), que significam pelo menos seis substâncias diferentes, observamos que no EECduaS as bandas 1 ($t_r = 30,9\text{min}$), 2 ($t_r = 32,5\text{min}$), 3 ($t_r = 35,4\text{min}$) e 4 ($t_r = 38,0\text{min}$) possuem maior intensidade, ou seja, estão em maior concentração; entretanto a banda 6 ($t_r = 49,7\text{min}$) possui maior intensidade no EECduaM e a banda 5 ($t_r = 43,4\text{min}$) possui igual intensidade.

Os perfis cromatográficos dos extratos aquosos, EACduaS e EACduaM, são bastante similares. Para a maioria das bandas não foi observado variação significativa na intensidade. A banda 2 ($t_r = 30,6\text{min}$) e 3 ($t_r = 34,6\text{min}$) possuem maior intensidade para o extrato EACduaS, as bandas 3 ($t_r = 32,1\text{min}$), 5 ($t_r = 37,5\text{min}$) e 6 ($t_r = 42,5\text{min}$) possuem maior intensidade no perfil do extrato EACduaM e a banda 1 ($t_r = 18,7\text{min}$) apresenta a mesma intensidade.

Os perfis cromatográficos nos mostram respostas químicas distintas, em termos de quantidade, devido ao ambiente em que as plantas foram coletadas, essa diferença também pode ser observada no potencial das atividades farmacológica.

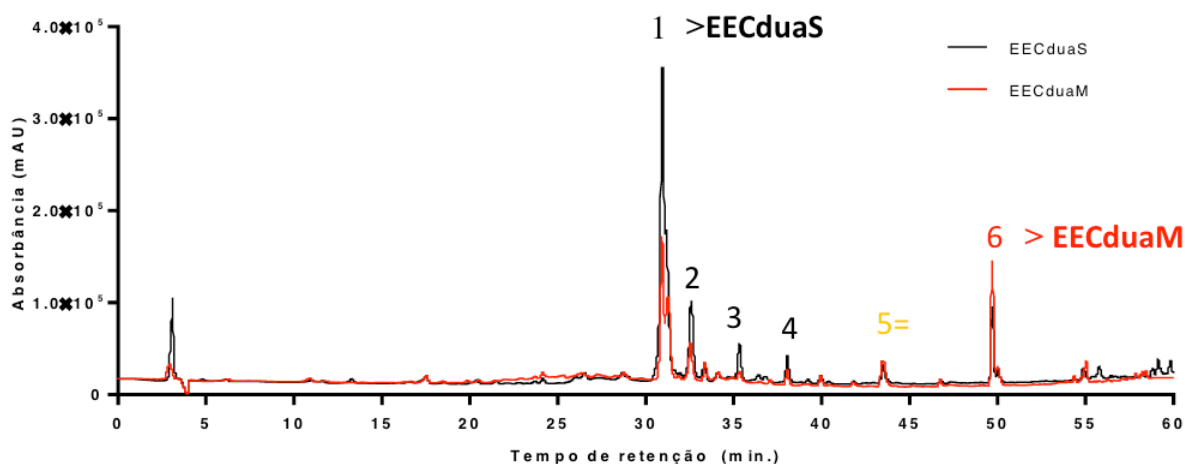


Figura 1. Perfil Cromatográfico obtido por CLAE do extrato etanólico de *Combretum duarteanum* do cerrado Setentrional e Meridional. Coluna C18 (250 x 4,6 mm 5 μm) eluído em gradiente com MeOH/H₂O 10%-100% em 60min, 1 mL/min, 254 nm).

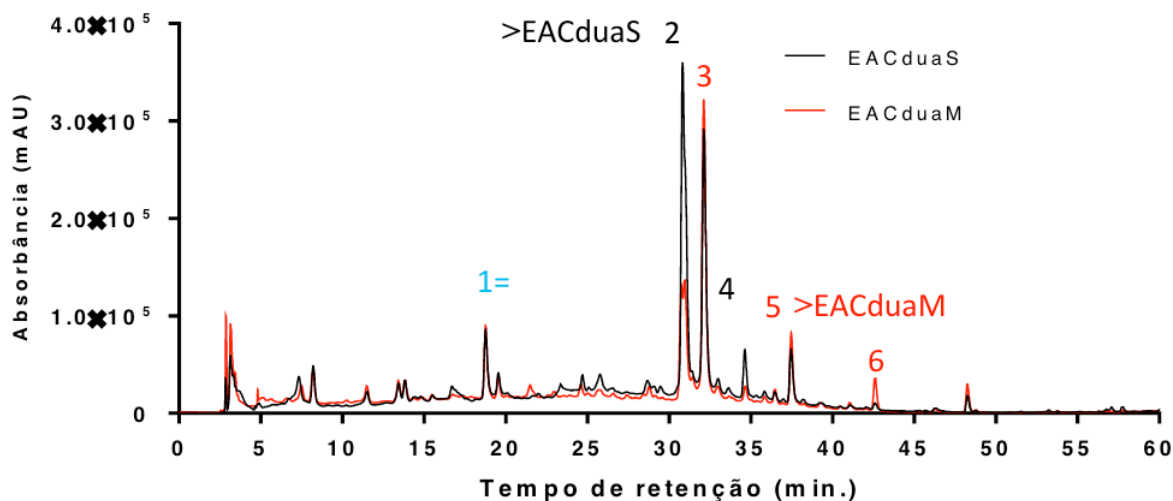


Figura 2. Perfil Cromatográfico obtido por CLAE do extrato aquoso de *Combretum duarteanum* do cerrado Setentrional e Meridional. Coluna C18 (250 x 4,6 mm 5 μ m) eluído em gradiente com MeOH/H₂O 5%-100% em 60min, 1 mL/min, 254 nm).

3.6 PCA *Combretum duarteanum* Cambess

Foi realizada uma Análise de Componentes Principais (PCA) sobre as Tabelas 1, 2 e 3 contendo os resultados dos testes farmacológicos realizados com os extratos de *C. duarteanum* coletados na região Meridional (CduaM) e na região Setentrional (CduaS) do estado do Piauí. A PCA aplicada foi capaz de explicar 76,4% da variância total dos dados. A Figura 3 mostra o resultado da PCA por meio do gráfico bi-plot (*scores* e *loading*) sob a perspectiva da PC-1 (45,0%) e da PC-2 (31,4%). Nenhuma variável e nenhuma amostra foi considerada discrepante.

Constata-se (Gráfico 1) que a separação entre o EHCduaS do EHCduaM se dá através PC-2 em função dos testes farmacológicos Fe⁺³/Fe⁺², FLAT, DPPH, Óxido nítrico, Hidroxila e TBARS, sendo as 5 primeiras mais relacionadas à amostra EHCduaM e apenas TBARS sendo correlacionada à EHCduaS. Verifica-se na Tabela 1, uma maior CE₅₀ no ensaio TBARS para o EHCduaS.

Os extratos etanólicos foram separados por meio da PC-1. A separação deu-se principalmente pelas variáveis hidroxila, óxido nítrico, TBARS, flavonoides totais e DPPH, com maiores valores para os testes com EECduaM (Tabelas 1 e 2). Sendo assim o EECduaS é o mais promissor para o desenvolvimento de produtos com atividade antioxidante.

A PC-1 faz a diferenciação dos extratos aquosos meridional e setentrional, esta distinção se dá principalmente pelas variáveis relacionadas às atividades antioxidantes e citotóxicas. Verifica-se pelo gráfico e Tabelas 1 e 3 que o EACduaM possui maior atividade citotóxica e menor atividade antioxidante evidenciada pelos ensaios.

O gráfico dos escores do PC-1 *versus* PC-2 com variância total explicada de 76,4%, nos mostra diferença entre os extratos das espécies coletadas no cerrado

Setentrional e Meridional. A partir de uma visão mais ampla da PC-1 comparando os extratos de origem Setentrional e Meridional é possível notar que há uma atribuição de maiores scores para os extratos Meridional. Ao se analisar os dados de *loadings* nota-se uma maior correlação de altos valores de scores com altos valores dos resultados nos testes relacionados às atividades antioxidantes (FLAT, DPPH, óxido nítrico, hidroxila, TBARS) e citotóxicas (HCT-116, OVCAR-8 e SF-295). Esses dados retratam que o conhecimento taxonômico não é suficiente para uma descrição fitoquímica da espécie, pois fatores ecológicos podem influenciar na resposta química ao ambiente.

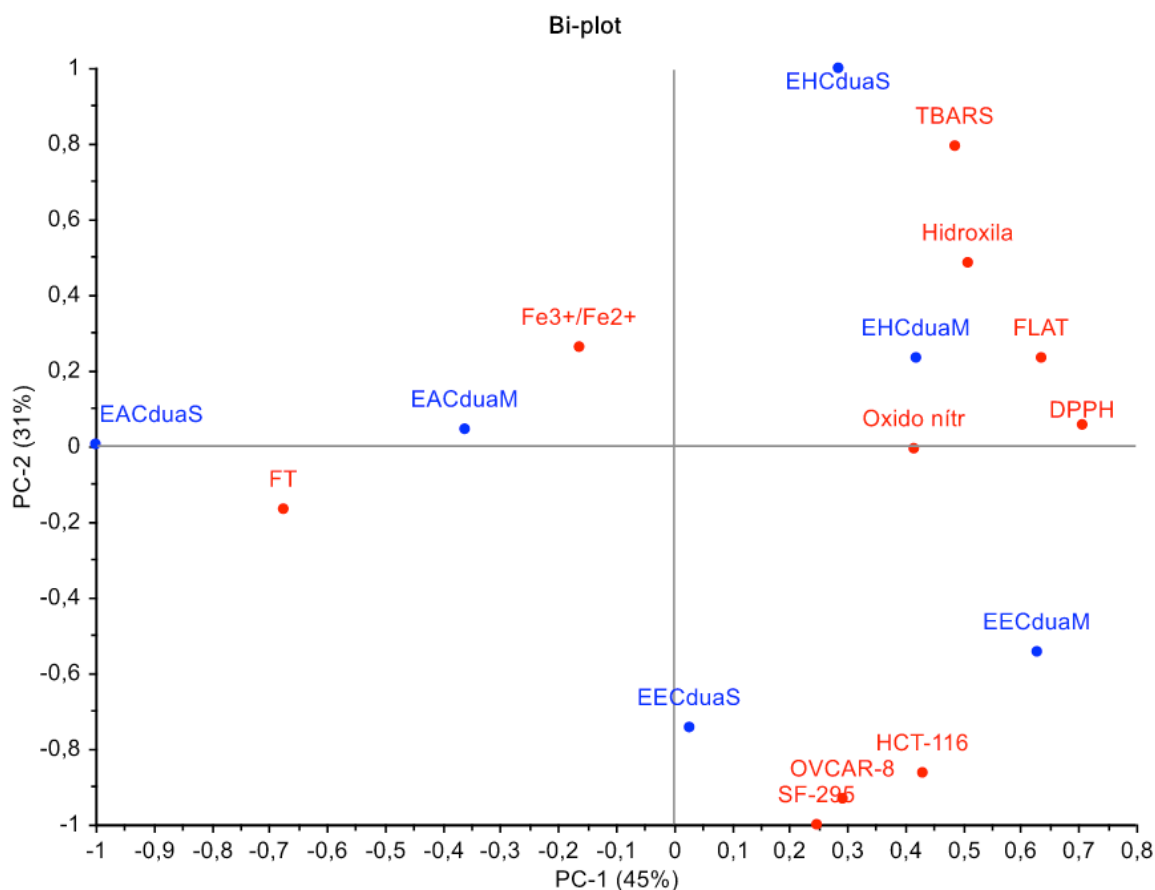


Gráfico 1. Gráfico biplot entre os dois primeiros componentes principais para os seis extratos de *Combretum duarteanum*.

4 | CONCLUSÃO

Os resultados obtidos na análise comparativa dos extratos hexânico, etanólico e aquoso de *Combretum duarteanum* coletada nos Cerrados Setentrional e Meridional apresentam potencial antioxidante, citotóxico e anticolinesterásico diferentes.

Os teores de fenóis e flavonoides totais obtidos indicam que estudos fitoquímicos comparativos de uma mesma espécie de áreas geográficas distintas podem mostrar a diversidade química, demonstrando a relevância desse tipo de trabalho para estudos biológicos, como: genética, molecular, taxonomia (quimiotaxonomia), manejo, dentre

outros, agregando valor à biodiversidade no contexto da biologia da conservação.

Desta forma fica claro que relações ecológicas devem ser levadas em consideração em estudos químicos e farmacológicos, sempre que possível, pois o conhecimento da espécie apenas botanicamente, ou apenas quimicamente, contribui pouco para o desenvolvimento sustentável que devemos perseguir.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, U. P.; MEDEIROS, P. M.; ALMEIDA, A. L. S.; MONTEIRO J. M.; LINS NETO, E. M. F.; MELO, J. G.; SANTOS, J. P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, p. 325-354, 2007.
- ALMEIDA, J. R. G. S.; CAMILA DE SOUZA ARAÚJO; PESSOA, C. Ó.; COSTA, M. P.; PACHECO, A. G. M. Atividade antioxidante, citotóxica e antimicrobiana de *Annona vepretorum* Mart. (Annonaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 36, n. sept., p. 258-264, 2014.
- BAST, A.; HAENEN, G. R. M. M.; DOELMAN, C. J. A. Oxidants and Antioxidants: State of the Art. **The American Journal of Medicine**, v. 91, p. 3-13, sept. 30, 1991.
- CASTRO, A. A. J. F.; BARROS, J. S.; COSTA, J. M.; SANTOS, M. P. D.; PIRES, M. F. O.; MENDES, M. R. A.; CASTRO, N. M. C. F.; FARIAS, R. R. S.; SOUSA, S. R. **Cerrados marginais do nordeste e ecótonos associados**: Sítio 10 do PELD (período 2001/2011). Teresina: EDUFPI/Gráfica do Povo, 2010.
- DAWE, A.; PIERRE, S.; TSALA, D. E.; HABTEMARIAM, S. Phytochemical Constituents of *Combretum* Loefl. **Pharmaceutical Crops**, v. 4, p. 38-59, 2013.
- ELDEEN, I. M. S.; VAS STADEN, J. *In vitro* pharmacological investigation of extracts from some trees used in Sudanese traditional medicine. **South Africa Journal of Botany**, v. 73, p. 435-440, 2007.
- ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES JR., V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, n. 1, p. 88-95, Jul. 1961.
- FARIAS, R. R. S.; CASTRO, A. A. J. F.; LOIOLA, M. I. B.; CHAVES, M. H.; PEREIRA, E. T. V. Botânica (aspectos morfológicos) e distribuição geográfica de três espécies de Combretaceae nos cerrados do Piauí, nordeste do Brasil. **Publicações Avulsas em Conservação de Ecossistema**, Teresina, n. 31, p.1-23, nov. 2014.
- FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.
- FERREIRA, É. L. F.; MASCARENHAS, T. S.; OLIVEIRA, J. P. C.; CHAVES, M. H.; ARAÚJO, B. Q.; CAVALHEIRO, A. J. Phytochemical investigation and antioxidant activity of extracts of *Lecythis pisonis* Camb. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 8, n. 8, p. 353-360, Feb. 2014.
- FYHRQUIST, P.; MWASUMBI, L.; HAEGGSTRÖM, C. A.; VUORELA, H.; HILTUNEN, R.; VUORELA, P. Ethnobotanical and antimicrobial investigation on some species of *Terminalia* and *Combretum* (Combretaceae) growing in Tanzania. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, p. 169-177, Feb. 2002.
- FYHRQUIST, P.; MWASUMBI, L.; VUORELA, P.; VUORELA, H.; HILTUNEN, R.; MURPHY, C.; ADLERCREUTZ, H. Preliminary antiproliferative effects of some species of *Terminalia*, *Combretum* and *Pteleopsis* collected in Tanzania on some human cancer cell lines. **Fitoterapia**, v. 77, p. 358-366, Jul. 2006.

- GOUVEIA, M. G. S.; XAVIER, M. A.; BARRETO, A. S.; GELAIN, D. P.; SANTOS, J. P. A.; ARAÚJO, A. A. S.; SILVA, J. F. A.; QUINTANS, U. S.; AGRA, M. F.; CABRAL, A. G. S.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Antioxidant, Antinociceptive, and Anti-inflammatory Properties of the Ethanolic Extract of *Combretum duarteanum* in Rodents. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, p. 1389-1396, Nov. 2011.
- GREEN L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPE, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of Nitrate, Nitrite, and [15N] Nitrate in Biological Fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, p. 131-138, Oct. 1982.
- LAMIDI, M.; DIGIORGIO, C.; DELMAS, F.; FAVEL, A.; EYELE MVE-MBA, C.; RONDI, M. L.; OLLIVIER, E.; NZE-EKEKANG, L.; BALANSARD, G. *In vitro* cytotoxic, antileishmanial and antifungal activities of ethnopharmacologically selected Gabonese plants. **Journal Ethnopharmacology**, v. 102, p. 185-190, 2005.
- LIMA, G. R. M.; MONTENEGRO, C. A.; FALCÃO, H. S.; JESUS, N. T.; CABRAL, A. G. S.; GOMES, I. F. F.; AGRA, M. F.; TAVARES, J. F.; BATISTA, L. M. Gastroprotective activity of the ethanolic extract and hexane phase of *Combretum duarteanum* Cambess (Combretaceae). **Journal of Natural Medicines**, v. 67, p. 492-502, Jul. 2013.
- LOPES, G. K. B.; SCHULMAN, H. M.; HERMES-LIMA, M. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1472, p. 142-152, 1999.
- MOSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.
- NASCIMENTO, S. C.; CHIAPPETA, A. A.; LIMA, R. M. O. C. Antimicrobial and cytotoxic activities in plants from Pernambuco, Brazil. **Fitoterapia**, v. 61, p. 353-355, 1990.
- NOGUEIRA NETO, J. D.; SOUSA, D. P.; FREITAS, R. M. Avaliação do potencial antioxidante *in vitro* do nerolidol. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas Aplicada**. v. 34, n. 1, p. 125-130, 2013.
- PANNANGPETCH, P.; TAEJARERNWIRIYAKUL, O.; KONGYINGYONES, B. Ethanolic extract of *Combretum decandrum* Roxb. decreases blood glucose level and oxidative damage in streptozotocin-induced diabetic rats. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 79, p. 107-108, 2008.
- PEIXOTO SOBRINHO, T. J. S.; GOMES, T. L. B.; CARDOSO, K. C. M.; AMORIM, E. L. C. Otimização de metodologia analítica para o doseamento de flavonoides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. **Química Nova**, v. 33, p. 288, 2010.
- POLLE, A.; DENNENBERG, H. Field studies on Norway spruce trees at high altitudes. II Defence systems against oxidative stress in needles. **New Phytol.**, v. 121, p. 635-642, 1992.
- POULSEN, H. E.; PRIME, H.; LOFT, S. Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 7, p. 9-16, 1998.
- QUINTANS, J. S. S.; COSTA, E. V.; TAVARES, J. F.; SOUZA, T. T.; ARAÚJO, S. S.; ESTEVAM, C. S.; BARISON, A.; CABRAL, A. G. S.; SILVA, M. S.; SERAFINI, M. R.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Phytochemical study and antinociceptive effect of the hexanic extract of leaves from *Combretum duarteanum* and friedelin, a triterpene isolated from the hexanic extract, in orofacial nociceptive protocols. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, p. 60-66, Jan./Feb. 2014.
- RHEE, I. K.; MEENT, M. V.; INGANINAN, K.; VERPOORTE, R. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. **Journal of Chromatography**. v. 915, p. 217-223, 2001.

SILVA, D. C.; CERCHIARO, G.; HONÓRIO, K. M. Relações patofisiológicas entre estresse oxidativo e arteriosclerose. **Química Nova**, v. 34, n. 2, p. 300-305, 2011.

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

SINGHAL, M.; PAUL, A.; SINGH, H. P. Synthesis and reducing power assay of methyl semicarbazone derivatives. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 18, p. 121-127, 2014.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. G.; VIEIRA-JR. G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, p. 351-355, 2007.

ZIDORN, C.; STUPPNER, H. Evaluation of Chemosystematic Characters in the Genus *Leontodon* (Asteraceae). **Taxon**, v. 50, n. 1, p. 115-133, Feb. 2001.

Capítulo 2

PERFIL FITOQUÍMICO DE ATIVIDADES
FARMACOLÓGICAS DE *Combretum mellifluum*
EICHLER DE DUAS ÁREAS DE CERRADO



PERFIL FITOQUÍMICO DE ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DE *Combretum mellifluum* EICHLER DE DUAS ÁREAS DE CERRADO

Data de aceite: 02/12/2019

Ruth Raquel Soares de Farias

Faculdade de Ensino Superior do Piauí - FAESPI
Teresina-PI

Erika Thalyta Veras Pereira

Universidade Federal de São Carlos -UFSCar São
Carlos-SP

Mariana Helena Chaves

Universidade Federal do Piauí, UFPI Teresina-PI

Paulo Michel Pinheiro Ferreira

Universidade Federal do Piauí, UFPI Teresina-PI

Chistiane Mendes Feitosa

Universidade Federal do Piauí, UFPI Teresina-PI

Claudia do Ó Pessoa

Universidade Federal do Ceará, UFC Fortaleza-
CE

George Laylson da Silva Oliveira

Instituto Federal de Educação Ciência e
Tecnologia de Mato Grosso, IFMT, Brasil

Rusbene Bruno Fonseca de Carvalho

Universidade Federal do Piauí, UFPI Teresina-PI

Jéssica Pereira Costa

Universidade Federal do Piauí, UFPI Teresina-PI

Antonio Alberto Jorge Farias Castro

Universidade Federal do Piauí, UFPI Teresina-PI

Samara Raquel de Sousa

UFPI - Universidade Federal do Piauí, UFPI
Teresina-PI BioTEN

variabilidade fitogeográfica, química e farmacológica dos extratos hexânico, etanólico e aquoso das folhas da espécie *Combretum mellifluum* Eichler. como contribuição para a caracterização química e farmacológica dos Cerrados Setentrional e Meridional do Piauí. O perfil químico dos extratos foi obtido por cromatografia líquida de alta eficiência. A atividade antioxidante foi avaliada pelos ensaios dos radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH), hidroxila e óxido nítrico, substâncias reagentes ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e redução do Fe^{3+} à Fe^{2+} . A determinação do teor de fenóis totais foi realizada pelo método de Folin–Ciocalteu e de flavonoides totais por redução com cloreto de alumínio. A atividade anticolinesterásica foi investigada pelo método de Ellman e a citotoxicidade pelo método de brometo de 3-(4,5dimetildiazol-2-il)-2,5difeniltretrazolium (MTT), frente a linhagens de células tumorais humanas (cólon, ovário e glioblastoma). O extrato aquoso *C. mellifluum* (Meridional) apresentou atividade antioxidante (CE_{50} $46,50 \pm 1,43$ mg/mL) maior do que o controle rotina no ensaio do DPPH. O extrato aquoso de *C. mellifluum* (Setentrional) apresentou alta atividade antioxidante na redução dos radicais óxido nítrico ($0,47 \pm 0,11$ mg/mL) e hidroxila ($0,76 \pm 0,13$ mg/mL). Os extratos hexânicos e etanólicos exibiram resultados positivos para o teste qualitativo

RESUMO: O presente estudo relata

de inibição da acetilcolinesterase. O extrato etanólico (Setentrional) foi fortemente ativo frente as três linhagens de células OVCAR-8 (carcinoma de ovário), HCT-116 (colonretal – humano) e SF-295 (glioblastoma – humano), com percentuais de inibição de $95,87\pm 0,32$; $83,89\pm 1,39$; $89,00\pm 1,18$ respectivamente. Os extratos etanólicos e aquosos apresentaram alto teor de fenóis e flavonoides totais. A análise dos perfis cromatográficos mostraram a variedade química, evidenciada também pela diferença na resposta das atividades biológicas dentro de uma mesma espécie.

PALAVRAS-CHAVE: Biodiversidade. Cerrados do Nordeste. Variabilidade Química.

PHYTOCHEMICAL PROFILE OF PHARMACOLOGICAL ACTIVITY OF *Combretum mellifluum* EICHLER FROM TWO CERRADO AREAS

ABSTRACT: This study reports for the first time the phylogeographic, chemical, and pharmacological variability of hexane, ethanolic and aqueous extracts from leaves of the species *Combretum mellifluum* Eichler. as a contribution to the chemical characterization of the Northern and Southern cerrado of Piauí. The chemical profile of the extracts was obtained by high-performance liquid chromatography (HPLC). The antioxidant activity was evaluated by the test of the radicals 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), hydroxyl and nitric oxide, reactive substances to thiobarbituric acid (TBARS), and reduction of Fe^{3+} to Fe^{2+} . The determination of total phenolic and flavonoid content was performed by the method of Folin-Ciocalteu and by reduction with aluminum chloride, respectively. The anticholinesterase activity was performed by Ellman's method. The cytotoxicity was measured by MTT cell proliferation assay against human tumor cell lines (colon, ovary and glioblastoma). The aqueous extract of *C. mellifluum* (Southern) presented higher antioxidant activity (EC_{50} 46.50 ± 1.43 mg/mL) than the routine (control) in the DPPH assay. The aqueous extract of *C. mellifluum* (Northern) showed high antioxidant activity in the reduction of radical nitric oxide (0.47 ± 0.11 mg/mL) and hydroxyl (0.76 ± 0.13 mg/mL). The hexane and ethanol extracts showed positive results for the qualitative test of inhibition of acetylcholinesterase. The ethanol extract (Northern) was strongly active against the three cell lines: OVCAR-8 (ovarian carcinoma), HCT-116 (colorectal - human) and SF-295 (glioblastoma - human), with inhibition percentage of 95.87 ± 0.32 ; 83.89 ± 1.39 ; 89.00 ± 1.18 respectively. The aqueous and ethanol extracts showed high concentration of total phenols and flavonoids. The analysis of chromatographic profiles revealed the chemical variety, which was also evidenced by the difference in the response of the biological activities within the same species.

KEYWORDS: Biodiversity. Cerrados of Northeast. Chemistry variability.

1 | INTRODUÇÃO

A presença de metabólitos secundários nas plantas está relacionada com várias funções ecológicas, entre elas: a defesa contra ataques de herbívoros e de patógenos, atrativo (odor, cor e sabor) para animais polinizadores, dispersores de sementes e microrganismos simbiotes, alelopatia, função estrutural e proteção

contra estresses bióticos (radiação solar, mudanças de temperaturas, deficiência de nutrientes minerais) (DALBONE; LANDO, 2010).

Com isso, fatores como desenvolvimento da planta e sazonalidade; índice pluviométrico e estacionalidade; temperatura e altitude, entre outros, apresentam correlações entre si e não atuam isoladamente, podendo influir em conjunto no metabolismo secundário (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

A diversidade biológica (riqueza, proporção de abundância dos indivíduos etc.) e química podem variar em função da amplitude (ou gradiente) latitudinal. Por isso é que há a necessidade de se considerar de forma conjunta a morfologia e o metabolismo, cada vez mais, para que aumente a eficiência da busca de produtos naturais específicos por uma abordagem biogeográfica (GOTTLIEB; KAPLAN; BORIN, 1996).

As mudanças morfológicas e químicas da flora angiospérmica ocorrem com maior frequência via ecótonos, que são repentinas transições geográficas com faixas limítrofes turbulentas, semelhantes às transições de fase físico-químicas. Nessas zonas ecogeográficas de tensão caracterizada pela quebra dos gradientes morfo-químicos surge maior complexidade estrutural e molecular (GOTTLIEB; BORIN, 1997a, b)

A flora piauiense apresenta uma diversidade bastante significativa e peculiar, devido os cerrados ocuparem uma posição marginal norte-nordeste ao cerrado central, apresentando também, uma das maiores extensões deste Bioma e de áreas de transição cerrado, caatinga e carrasco do Nordeste (CASTRO, 1994a, b).

Combretum Loeft. é o maior e mais difundido gênero de Combretaceae. Compreende aproximadamente 250 espécies distribuídas em todas as regiões tropicais, principalmente na África e Ásia (LOIOLA; SALES, 1996; JOLY, 2002; KATERERE, 2003; STACE, 2010).

Devido ao aumento de investigações químicas e farmacológicas, *Combretum* Loeft. mostrou seu potencial como fonte de vários metabólitos secundários. Os extratos de *Combretum* tem mostrado bioatividades *in vitro*, como antibacterianas, antifúngicas, anti-hiperglicémica, citotoxicidade contra várias linhas de tumor de células humanas, anti-inflamatória, antiofídica, antimaláricas e efeitos antioxidantes. Em estudos *in vivo* através de vários modelos animais também têm mostrado resultados promissores. No entanto, constituintes químicos e bioatividades da maioria das espécies deste gênero altamente diversificadas não foram investigadas (DAWE et al., 2013).

O presente trabalho tem como objetivo relatar o potencial farmacológico e o perfil químico comparativo de extratos das folhas de *Combretum mellifluum* Eichler., em diferentes áreas de Cerrado do Piauí, contribuindo para auxiliar nas informações sobre interações ecológicas do vegetal com seu ambiente.

2 | MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

O Material vegetal utilizado foram folhas de *Combretum mellifluum* Eichler, coletadas em janeiro de 2012 nos municípios de Campo Maior - PI (área de Cerrado Setentrional), coordenadas 04°46'08.8" S, 42°17'45.6" W e altitude de 90 m.n.m. e Bom Jesus - PI (área de Cerrado Meridional), 09°18'45.5" S, 44°32'43.6" W e altitude de 370 m.n.m. Os exemplares testemunhos foram incorporados ao acervo do Herbário Graziela Barroso (TEPB) da Universidade Federal do Piauí, sob os números TEPB 28.192 e TEPB 28.344, respectivamente. A determinação botânica ao nível de espécie foi realizada pela Dra. Maria Iracema Bezerra Loiola da Universidade Federal do Ceará - UFC, especialista na Família Combretaceae.

2.2 Preparação dos extratos

As folhas foram desidratadas à temperatura ambiente em local arejado, em seguida moídas, em moinho de facas e submetidas ao procedimento de extração por maceração por três vezes, com hexano, etanol e água sucessivamente. Cada extração teve a duração de 72 horas. Após o solvente ser removido por destilação em rotaevaporador, a água residual foi removida por liofilização. Foram obtidos os seguintes extratos: Extrato hexânico de *Combretum mellifluum* do cerrado Setentrional (EHCmelS 8,88 g; 0,94%), Extrato etanólico de *C. mellifluum* do cerrado Setentrional (EECmelS 70,62 g; 7,46%), Extrato aquoso de *C. mellifluum* do cerrado Setentrional (EACmelS 48,85 g; 5,16%), Extrato hexânico de *Combretum mellifluum* do cerrado Meridional (EHCmelM 4,83 g; 0,41%), Extrato etanólico de *C. mellifluum* do cerrado Meridional (EECmelM 67,97 g; 5,83%), Extrato aquoso de *C. mellifluum* do cerrado Meridional (EACmelM 46,11 g; 2,96%).

2.3 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante *in vitro* foi avaliada por meio do ensaio de substâncias reagentes ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (SILVA et al., 2007), radical hidroxila (LOPES; SCHULMAN; HERMES-LIMA, 1999), óxido nítrico (NOGUEIRA NETO; SOUSA; FREITAS, 2013) e potencial redutor (SINGHAL et al., 2014) nas concentrações de 0,9, 1,8, 3,6, 5,4, 7,2 µg/mL, bem com o DPPH (SOUSA et al., 2007) nas concentrações de 25, 50, 100, 150, 200 e 250 µg/mL.

2.4 Teor de fenóis totais

O teor de fenóis totais foi realizado de acordo com o método de Folin-Ciocalteu (SOUSA et al., 2007). A leitura das absorbâncias das soluções foi realizada no comprimento de onda de 700 nm. O resultado foi definido pela interpolação da

absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico e expressa por $A = 0,1185c - 0,0453$, com coeficiente de correlação linear igual a 0,999, onde “c” é a concentração de ácido gálico e “A” é a absorbância, sendo apresentado em miligramas de equivalente de ácido gálico por grama de extrato (mg de EAG/g).

2.5 Teor de flavonoides

O teor de flavonoide totais das soluções dos extratos (1 µg/mL) foi determinado pela medida das absorbâncias em comprimento de onda de 420 nm (PEIXOTO SOBRINHO et al., 2010; FERREIRA et al., 2014). O resultado foi calculado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com o padrão rutina, expressa por $A = 0,02618c - 0,00717$, onde “A” é a absorbância da amostra e “c” é a concentração da rutina, com um coeficiente de correlação linear igual a 0,999 e expresso em miligrama de equivalente de rutina por grama de extrato (mg de ER/g).

2.6 Atividade anticolinesterásica

O teste qualitativo para a inibição da enzima acetilcolinesterase foi realizado utilizando soluções metanólicas dos extratos (10 mg/mL) aplicadas em placa de gel de sílica eluída em clorofórmio/metanol (9:1) e reveladas com reagente de Ellman (ELLMAN et al., 1961; RHEE et al., 2001). O resultado é observado por meio da comparação entre os spots das amostras e do padrão cafeína.

2.7 Atividade citotóxica

A atividade citotóxica foi avaliada frente as linhagens celulares HCT-116 (colorretal humano), OVCAR-8 (ovário humano) e SF-295 (glioblastoma humano), cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA), conforme o método brometo de 3-(4,5dimetildiazol-2-il)-2,5difeniltretrazolium (MTT) descrito por Mosmann (1983) seguindo Almeida et al. (2014).

2.9 Cromatografia líquida de alta eficiência

Os perfis cromatográficos foram obtidos em Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em escala analítica com equipamento *Shimadzu Prominence System* - sistema binário de bombas LC-6AD, detector UV SPD-20A e injetor manual. A coluna utilizada foi a C18 Shim-pack CLCDS(M) de 250 x 4,6 mm e partícula de 5 µm. As amostras analisadas foram submetidas a um tratamento, utilizando membrana filtrante de 0,45 µm. A eluição foi realizada com MeOH/H₂O em modo gradiente (5 □ 100% em 60min), com fluxo de 1,0 mL/min, temperatura ambiente (25

°C) e injeção de 20 μ L de solução do extrato em uma concentração de 5,0 mg/mL. Os cromatogramas foram obtidos no comprimento de onda de 254 nm.

2.9 Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), constituído de seis tratamentos, com três repetições. Os resultados foram submetidos à análise da variância (ANOVA) pelo teste *F* e as médias comparadas pelo teste de Tukey adotando-se nível de significância a 5% de probabilidade. Na determinação da atividade antioxidante (AA) pelo ensaio DPPH foi utilizado o DIC em esquema fatorial 4 x 6 x 2 (4 extratos, 6 concentrações e 2 áreas de cerrado). A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa ASSISTAT, versão 7.7 (2009), licenciado pela Universidade Federal de Campina Grande. Utilizou-se os programas *Microcal Origin 8.0* e/ou *IBM SPSS Statistic 20* para o cálculo das CE_{50} .

A fim de avaliar a similaridade das atividades farmacológicas entre os extratos das folhas de *C. mellifluum* foram realizadas análises de componentes principais (PCA). Foi empregada nesta análise multivariada, o software programa Unscrambler® X, versão 10.2 (Camo, Noruega).

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Atividade antioxidante pelo ensaio de DPPH

Nos últimos anos são inúmeros os estudos sobre radicais livres e novos métodos para avaliação de atividade antioxidante. Acredita-se que o impulso a busca por novas substâncias capazes de prevenir ou minimizar os danos oxidativos às células vivas, dá-se às descobertas do efeito deletério dos radicais livres sobre as células e sua relação com certas doenças (ALVES et al., 2013).

O potencial dos diferentes extratos da espécie *C. mellifluum* em sequestrar radicais livres foi expresso como concentração final do extrato necessária para inibir a oxidação do radical DPPH em 50%, e os resultados são descritos nas Figuras 1 e 2.

Os extratos aquosos da espécie *C. mellifluum* apresentaram baixo CE_{50} tanto para o Cerrado Setentrional como para o Cerrado Meridional. O EACmeIM, exibe a maior atividade antioxidativa ($CE_{50} = 46,50 \pm 1,43 \mu\text{g/mL}$), mostrando-se comparável ao controle positivo, rutina, ($CE_{50} = 47,08 \pm 4,65 \mu\text{g/mL}$), essa performance pode ser atribuída à habilidade de sequestrar radicais livres por meio da doação de hidrogênio, visto que o extrato mencionado apresentou alto teor de compostos fenólicos. Enquanto o EECmeIM apresentou o maior valor de CE_{50} ($380,87 \pm 11,88 \mu\text{g/mL}$), conseqüentemente a menor atividade antioxidante. Para os EHCmeIS e EHCmeIM

não foi possível calcular a CE_{50} , pois a maior concentração testada ($250 \mu\text{g/mL}$) não foi capaz de reduzir os radicais DPPH em 50%.

Os resultados da avaliação quantitativa da atividade antioxidante (%AA) dos extratos de *C. mellifluum* (folhas) e do controle positivo para o Cerrado Setentrional e Meridional, (Gráficos 1 e 2), mostrou que todos os extratos da espécie têm atividade sequestradora do radical DPPH, contudo o EHCmeIS foi o menos ativo nas seis concentrações. As demais amostras de extratos, na concentração de $250 \mu\text{g/mL}$, apresentaram atividade antioxidante superior a 80%, atingindo um máximo de $94,93 \pm 0,41\%$ para o EACmeIS contra $94,14 \pm 0,22\%$ da rutina.

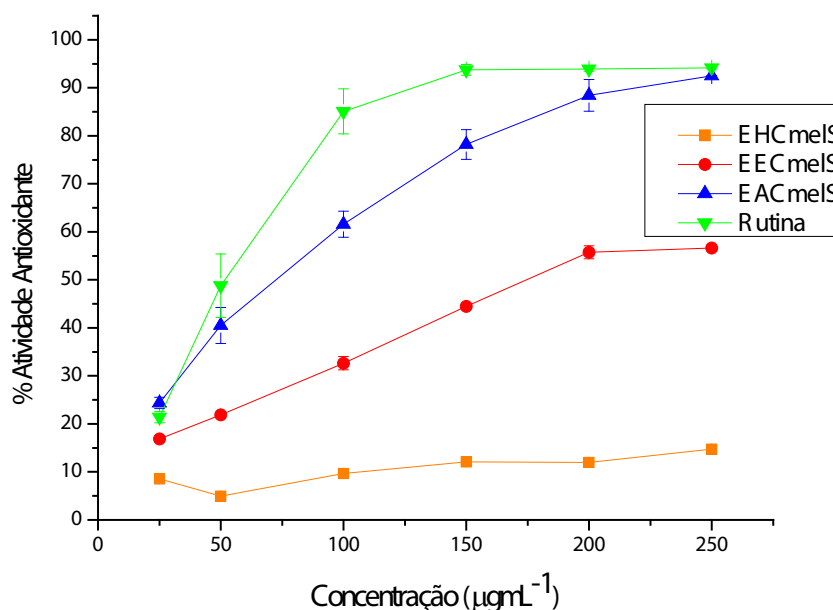


Gráfico 1 - Porcentagem de atividade antioxidante dos extratos hexânico (EHCmeIS), etanólico (EECmeIS) e aquoso (EACmeIS) das folhas de *Combretum mellifluum* Eichler. do Cerrado Setentrional e do padrão Rutina.

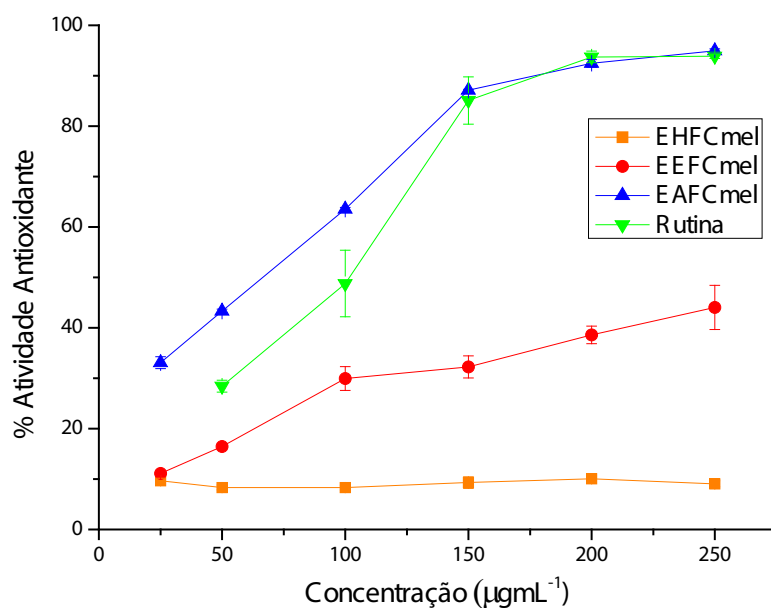


Gráfico 2. Porcentagem de atividade antioxidante dos extratos hexânico (EHFcmelM), etanólico (EEFCmelM) e aquoso (EAFcmelM) das folhas de *Combretum mellifluum* do Cerrado Meridional e do padrão Rutina.

3.2 Avaliação do potencial antioxidante contra a formação de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Nos extratos houve redução da peroxidação lipídica em relação ao controle Trolox (0,23 µg/mL), tendo destaque por possuir maior atividade antioxidante o EAFcmelS (0,51 µg/mL). A ordem decrescente da atividade antioxidante no ensaio TBARS para os extratos de *Combretum mellifluum* Eichler, foi a seguinte: EAFcmelS > EAFcmelM > EEFCmelM > EEFCmelS > EHFcmelM e > EHFcmelS (Tabela 2).

3.3 Avaliação do potencial antioxidante contra a formação do radical hidroxila

Os resultados evidenciaram uma diminuição significativa na degradação da 2-desoxirribose, este fato, sugere que extratos de *C. mellifluum* são capazes de sequestrar o radical hidroxila e bloquear a reação de produção do malonaldeído (MDA) que ao reagir com o ácido tiobarbitúrico forma cromógeno que absorve no comprimento de onda 532 nm.

Os extratos aquosos dos espécimes do Cerrado Setentrional e Meridional apresentaram maior atividade antioxidante. O EAFcmelS mostrou resultado igual ao do controle positivo Trolox ($CE_{50} = 0,76 \mu\text{g/mL}$), sendo o extrato com a maior atividade antioxidante. O EAFcmelM, embora apresentando boa atividade ($CE_{50} = 0,83 \mu\text{g/mL}$), manteve-se inferior ao do controle positivo (Tabela 2).

A comparação entre os valores de CE_{50} para os extratos da espécie *C. mellifluum* coletada nos dois cerrados indica que os extratos hexânicos apresentaram a menor atividade antioxidante, com resultados de $CE_{50} = 3,79 \mu\text{g/mL}$ e $3,13 \mu\text{g/mL}$ para o

EHCmeIS e o EHCmeIM, respectivamente (Tabela 1).

3.4 Avaliação do potencial antioxidante contra a formação do radical óxido nítrico

A avaliação dos extratos de *C. mellifluum* como substância sequestradora do radical óxido nítrico (NO·) também foi testada pela sua capacidade de remoção do nitrito pelo método de Griess (RAMOS et al., 2006). Os resultados apresentados da Tabela 2 demonstram que os extratos etanólicos e aquosos, tanto do Cerrado Setentrional como do Meridional, foram os mais ativos, sendo superiores ao controle positivo Trolox ($CE_{50} = 3,23 \mu\text{g/mL}$). O EACmeIS se destacou com maior potencial antioxidante ($CE_{50} = 0,47 \mu\text{g/mL}$). Novamente, os extratos hexânicos dos dois cerrados apresentaram as menores atividades antioxidantes, em concordância com os outros testes de atividade antioxidante.

3.5 Avaliação do potencial redutor

Nesse caso, os extratos das folhas de *C. mellifluum*, apresentaram valores de CE_{50} variando de $9,13 \pm 0,15$ à $10,00 \pm 0,18 \text{ } \mu\text{g/mL}$, para o EACmeIM e EHCmeIS, respectivamente, enquanto o valor encontrado para o Trolox foi de $2,13 \text{ } \mu\text{g/mL}$ (Tabela 1). Dessa forma, os resultados apontam baixos valores em relação a capacidade doadora de elétrons.

Extrato/ Ensaio antioxidante	DPPH	Hidroxila	Oxido nítrico	TBARS	Fe ³⁺ /Fe ²⁺
EHCmeIS	ND	3,79±0,18	3,76±0,15	3,65±0,18	10,00±0,18
EECmeIS	193,77±6,75	1,53±0,25	1,14±0,21	1,39±0,24	9,42±0,15
EACmeIS	69,27±8,62	0,76±0,13	0,47±0,11	0,51±0,11	9,19±15,30
EHCmeIM	ND	3,13±0,26	3,34±0,22	3,08±0,24	9,63±0,10
EECmeIM	380,87±11,88	1,18±0,22	0,74±0,15	0,71±0,15	9,27±0,13
EACmeIM	46,50±1,43	0,83±0,17	0,77±0,15	0,63±0,09	9,13±0,15
*Rutina	47,08±4,65	±	±	±	±
*Trolox		0,76	3,23	0,23	2,13

Tabela 1 – Atividade antioxidante (CE_{50}) dos extratos hexânicos, etanólicos e aquosos de *Combretum mellifluum* do Cerrado Setentrional e Meridional do estado do Piauí

EHCmeIS: Extrato hexânico de *Combretum mellifluum* do Cerrado Setentrional; EECmeIS: Extrato etanólico de *C. mellifluum* do Cerrado Setentrional; EACmeIS: Extrato aquoso de *C. mellifluum* do Cerrado Setentrional; EHCmeIM: Extrato hexânico de *C. mellifluum* do Cerrado Meridional; EECmeIM: Extrato etanólico de *C. mellifluum* do Cerrado Meridional; EACmeIM: Extrato aquoso de *C. mellifluum* do Cerrado Meridional; ND: não determinado.

3.6 Avaliação do teor de fenois e flavonoides totais

A Tabela 2 apresenta os teores encontrados de fenólicos totais (FT) e flavonoides

totais (FLAT) dos extratos de *C. mellifluum* analisados. Os teores encontrados variaram de $73,81 \pm 1,56$ a $342,76 \pm 1,91$ mg equivalente de ácido gálico por grama de extrato para fenólicos totais e de $128,30 \pm 2,08$ a $511,40 \pm 5,08$ mg equivalente de rutina por grama de extrato para flavonoides totais.

Extrato	FT mg de EAG/g Extrato	FLAT mg de ER/g Extrato
EHCmeIS	$73,81 \pm 1,56$ ^f	$179,10 \pm 5,11$ ^d
EECmeIS	$180,63 \pm 4,23$ ^c	$511,40 \pm 5,08$ ^a
EACmeIS	$342,76 \pm 1,91$ ^a	$136,24 \pm 0,39$ ^e
EHCmeIM	$113,54 \pm 2,32$ ^d	$358,24 \pm 5,44$ ^b
EECmeIM	$86,86 \pm 3,41$ ^e	$128,30 \pm 2,08$ ^e
EACmeIM	$212,22 \pm 1,04$ ^b	$202,87 \pm 1,79$ ^c

Tabela 2 – Teores de fenois totais (FT) e flavonoides totais (FLAT) dos extratos hexânicos, etanólicos e aquosos de *C. mellifluum* dos Cerrados Setentrional e Meridional

FLAT: Flavonoides totais; EAG: Equivalente de ácido gálico; ER: Equivalente de rutina; EHCmeIS: Extrato hexânico de *Combretum mellifluum* do Cerrado Setentrional; EECmeIS: Extrato etanólico de *C. mellifluum* do Cerrado Setentrional; EACmeIS: Extrato aquoso de *C. mellifluum* do Cerrado Setentrional; EHCmeIM: Extrato hexânico de *C. mellifluum* do Cerrado Meridional; EECmeIM: Extrato etanólico de *C. mellifluum* do Cerrado Meridional; EACmeIM: Extrato aquoso de *C. mellifluum* do Cerrado Meridional. Os resultados acima são a média \pm desvio padrão (n=3). Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem entre si significativamente pelo teste F (ANOVA) a 5% de probabilidade.

Todos os teores de fenois e flavonoides totais para os extratos de *C. mellifluum* mostraram diferença estatística significativa a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

As variações nas concentrações de fenólicos totais e de flavonoides totais ocorre em função de diferentes fatores, como a ecologia da vegetação (PARK et al., 2002) e pela flora local e região da coleta (BANKOVA, 2005; SOUSA et al., 2007).

O extrato que apresentou o teor mais elevado de fenólicos totais foi o EACmeIS ($342,76 \pm 1,91$ mg, equivalente de ácido gálico por grama de extrato). Quanto aos flavonoides totais, o extrato que apresentou o teor mais elevado foi o EECmeIS ($511,40 \pm 5,08$ mg, equivalente de rutina por grama de extrato). Cabe ressaltar que o Cerrado Setentrional apresentou os extratos mais ricos em teores totais de fenois e flavanoides.

3.7 Atividade anticolinesterásica

A resposta positiva do teste, foi a observação de manchas brancas semelhantes ao padrão cafeína nas placas de cromatografia em camada delgada. Essa atividade foi evidenciada nos extratos hexânicos e etanólicos do Cerrado Setentrional e Meridional (EHCmeIS, EECmeIS, EHCmeIM e EECmeIM).

Os extratos aquosos, tanto do Cerrado Setentrional como do Meridional não apresentaram essa atividade.

3.8 Atividade citotóxica

A citotoxicidade dos extratos hexânicos, etanólicos e aquosos das folhas de *C. mellifluum* foi avaliada frente a três linhagens de células, HCT-116 (colorectal – humano), OVCAR-8 (carcinoma de ovário) e SF-295 (glioblastoma – humano). Os resultados são apresentados em porcentagem de atividade citotóxica (Tabela 3). Percentuais entre 1-50% são considerados fracos, entre 50-75% moderados e entre 75-100% fortes.

Extrato/ Linhagem	HCT-116	OVCAR-8	SF-295
EHCmelS	45,31±6,03 ^b	36,90±34,45 ^{ab}	37,00±2,79 ^b
EECmelS	95,87±0,32 ^a	83,89±1,39 ^{ab}	89,00±1,18 ^a
EACmelS	68,35±3,85 ^b	57,93±1,07 ^{ab}	41,65±3,91 ^b
EHCmelM	1,94±5,97 ^c	-8,24±3,90 ^b	10,37±11,52 ^c
EECmelM	49,09±17,77 ^b	37,81±43,87 ^{ab}	89,48±3,84 ^a
EACmelM	10,83±9,40 ^c	21,96±13,06 ^{ab}	35,70±18,02 ^b
*Doxorrubicina	96,80±4,60 ^a	100,0±0,70 ^a	83,60±3,00 ^a

Tabela 3 – Porcentagem da atividade citotóxica dos extratos hexânicos, etanólicos e aquosos de *C. mellifluum* do Cerrado Setentrional e Meridional frente a três linhagens celulares

EHCmelS: Extrato hexânico de *Combretum mellifluum* do Cerrado Setentrional; EECmelS: Extrato etanólico de *C. mellifluum* do Cerrado Setentrional; EACmelS: Extrato aquoso de *C. mellifluum* do Cerrado Setentrional; EHCmelM: Extrato hexânico de *C. mellifluum* do Cerrado Meridional; EECmelM: Extrato etanólico de *C. mellifluum* do Cerrado Meridional; EACmelM: Extrato aquoso de *C. mellifluum* do Cerrado Meridional; HCT-116: colorretal humano; OVCAR-8: ovário humano; SF-295: glioblastoma humano. Os resultados acima são a média ± desvio padrão (n=3). Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem entre si significativamente pelo teste F (ANOVA) a 5% de probabilidade.

O extrato etanólico de *C. mellifluum* do Cerrado Setentrional (EECmelS), apresentou forte atividade citotóxica em todas as células testadas, com 95,87%, 89,00% e 83,89% para HCT-116, SF-295 e OVCAR-8, respectivamente. O EECmelM foi o único do Cerrado Meridional que promoveu a inibição de crescimento celular em 89,48% frente a linhagem SF-295 (glioblastoma humano), mostrando-se superior ao controle positivo Doxorrubicina.

3.9 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Os perfis cromatográficos dos extratos etanólicos, EECmelS e EECmelM, são bastante similares. A diferença se encontra na intensidade das bandas em 31,6; 35,8 e 39,9min que são mais intensas no EECmelS. Bandas com mesmo tempo de retenção, mas com diferença de intensidade significa que a substância que as bandas representam estão em concentração diferente, quanto mais alta a banda cromatográfica, maior a concentração (Figura 1).

A análise dos perfis cromatográficos dos extratos aquosos, EACmelS e

EACmeIM, sugere que há pouca similaridade entre eles. As bandas com tempo de retenção de 13,2; 16,1; 18,8; 33,3; 37,7 e 42,8min possuem maior intensidade no extrato aquoso de *Combretum mellifluum* Meridional (EACmeIM), indicando maior concentração das substâncias neste extrato. Além disto a banda em 10,2min, é a mais intensa no EACmeIS (Figura 2).

A diversidade observada nos perfis cromatográficos ressalta a diferença nos extratos da espécie em estudo, devido às condições ambientais quando as folhas foram coletadas, o que foi observado também nas atividades farmacológicas.

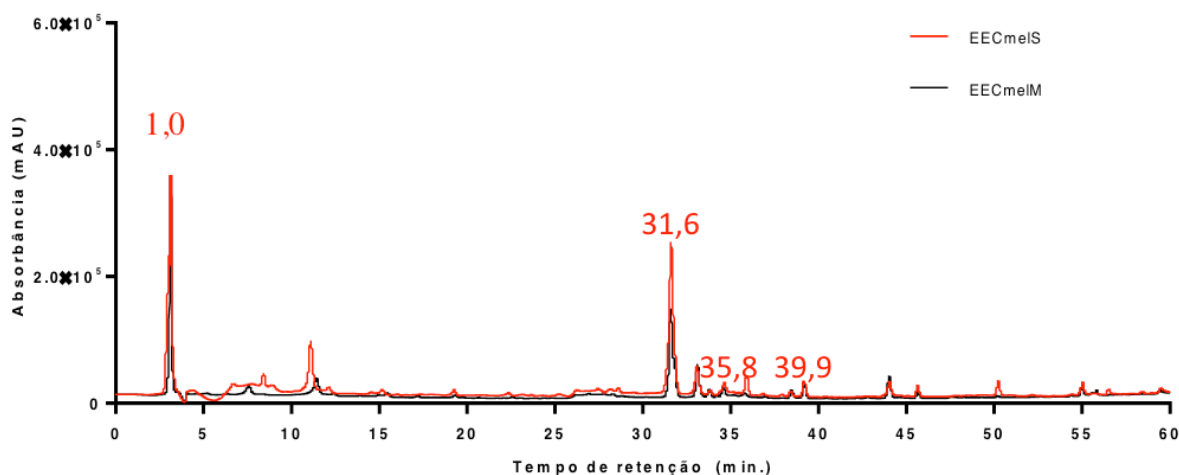


Figura 1 - Perfil cromatográfico obtido por CLAE do extrato etanólico de *Combretum mellifluum*. Coluna C18 (250 x 4,6 mm 5 μ m) eluído em gradiente com MeOH/H₂O 5%-100% em 60min, 1mL/min, 254 nm).

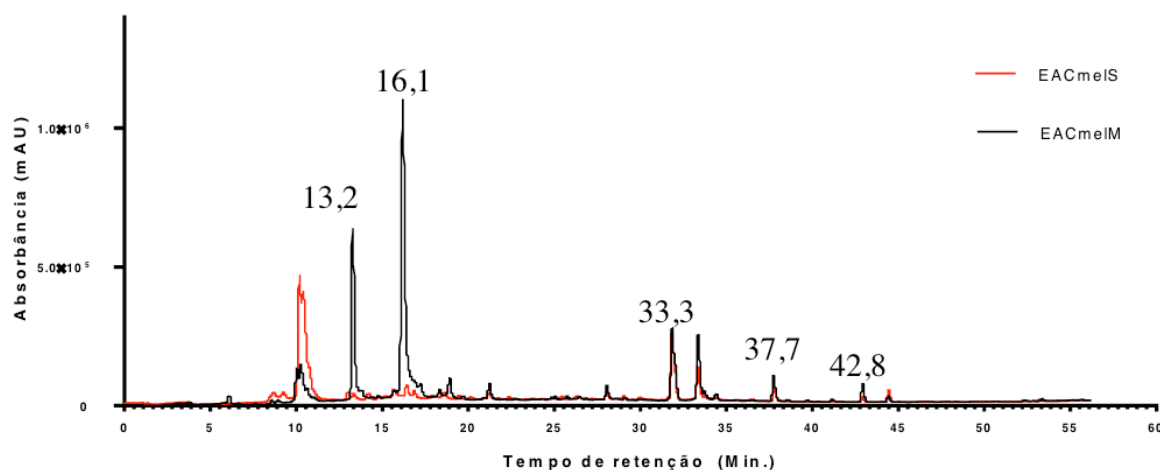


Figura 2 - Perfil Cromatográfico obtido por CLAE do extrato aquoso de *Combretum mellifluum*. Coluna C18 (250 x 4,6 mm 5 μ m) eluído em gradiente com MeOH/H₂O 5%-100% em 60min, 1mL/min, 254 nm).

3.10 Análise de Componentes Principais (PCA)

Os dois componentes principais juntos possibilitaram uma ordenação bidimensional dos extratos e atividades farmacológicas, o que permitiu a construção de um gráfico biplot. A quantidade da informação total das variáveis originais, retida

pelos dois componentes principais, foi 78%, sendo 52% correspondente ao primeiro componente principal (PC1) e 26% ao segundo componente principal (PC2).

A análise dos dados químicos e farmacológicos pela técnica de PCA permitiu agrupar quimicamente as amostras em três grupos, de modo a expressar e evidenciar suas semelhanças e diferenças (Gráficos 3, 4 e 5).

A análise do gráfico de scores (Gráfico 3) mostra a separação das amostras em três grupos, ou seja, o grupo I (extratos hexânicos), localizados à direita da PC1 (correlações positivas), grupo II (extratos etanólicos) e grupo III (extratos aquosos), ambos localizados à esquerda da PC1 (correlações negativas).

De acordo com o primeiro componente principal (PC1) pode-se observar que houve separação em função do grau de polaridade do solvente, os extratos obtidos com solvente apolar (hexânico) encontram-se no primeiro e no quarto quadrante, enquanto que os extratos obtidos por solventes mais polares encontram-se no segundo (etanólico) e no terceiro quadrante (aquoso).

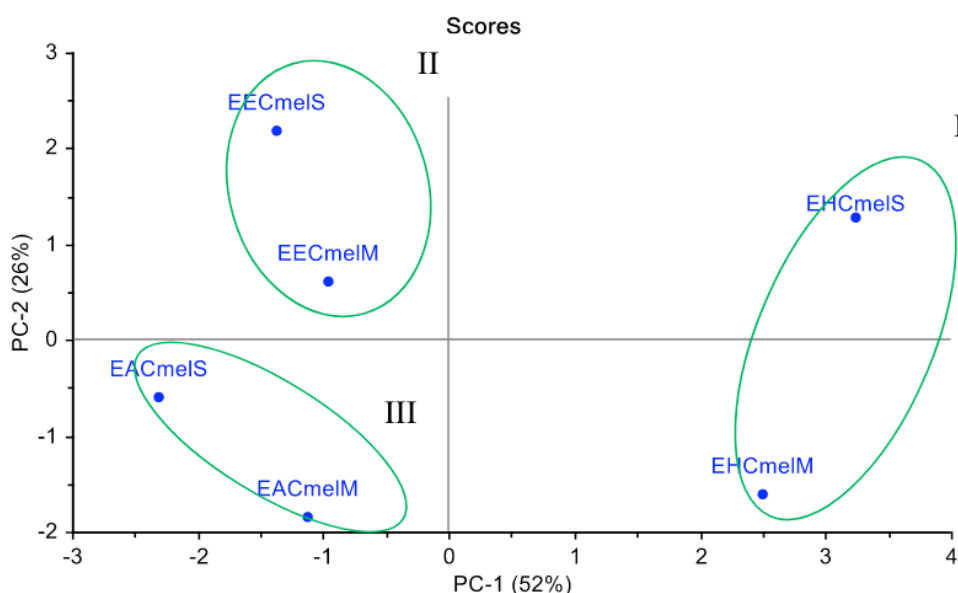


Gráfico 3 - Gráfico bidimensional PC1 x PC2 dos scores para diferentes extratos da espécie *C. mellifluum* coletadas no Cerrado Setentrional e Meridional no estado do Piauí

Pode-se afirmar que o grau de polaridade do solvente escolhido para a extração resulta em uma separação mais significativa dos extratos, já que isso foi observado na PC1 que representou 52% das informações.

A análise do gráfico de loadings (Gráfico 4) mostra a separação das atividades farmacológicas das amostras em três grupos, ou seja, o grupo I (FLAT, DPPH, Fe^{3+}/Fe^{2+} , Hidroxila, TBARS, Oxido nítrico), grupo II (HCT-116, OVCAR-8, SF-295) e grupo III (FT).

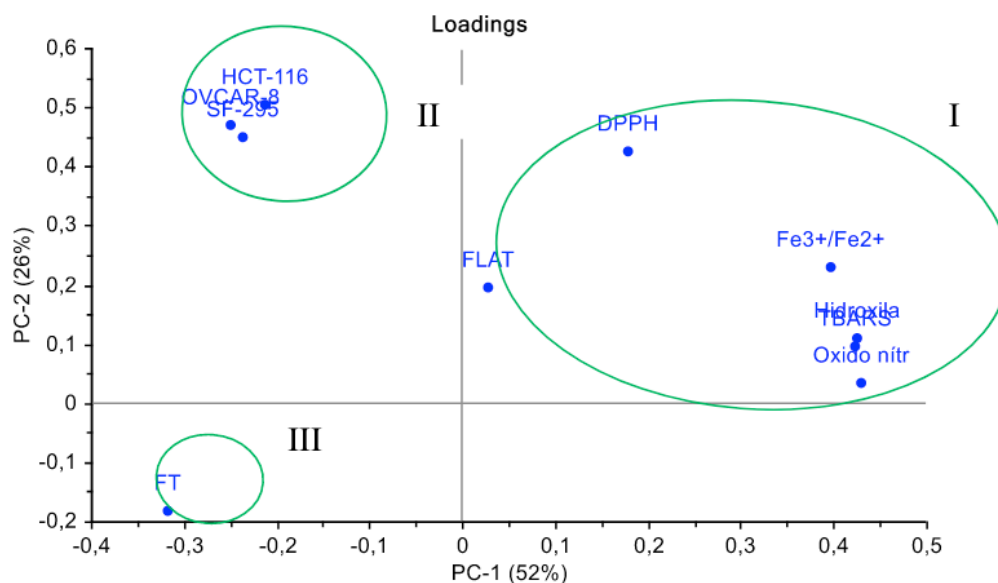


Gráfico 4 - Gráfico bidimensional PC1 x PC2 dos *loadings* para diferentes atividades farmacológicas da espécie *C. mellifluum* coletadas no Cerrado Setentrional e Meridional no estado do Piauí

A análise dos dados *loadings* revela uma maior correlação de altos valores de scores com altos valores dos resultados nos ensaios relacionados às atividades antioxidantes (DPPH, Fe³⁺/Fe²⁺, Hidroxila, TBARS, Oxido Nítr e FLAT), bem como das atividades citotóxicas (HCT-116, OVCAR-8, SF-295), retratando que o conhecimento taxonômico não é suficiente para a descrição fitoquímica da espécie em estudo, uma vez que fatores ecológicos podem influenciar a resposta química da mesma frente ao ambiente. Os compostos fenólicos totais (FT) foram os mais divergentes.

No Gráfico 5 apresenta-se o gráfico biplot PC1 x PC2 dos *loadings* e scores, relacionando os dados das atividades farmacológicas da espécie *Combretum mellifluum*, com os próprios extratos das folhas, de modo a correlacioná-los, agrupando-os em três grupos.

Observa-se que a separação dos extratos hexânicos, grupo I (EHCmeIS e EHCmeIM) se dá através da PC1 em função das atividades antioxidantes e dos flavonoides totais (FLAT, DPPH, Fe³⁺/Fe²⁺, Hidroxila, TBARS, Oxido nítr), sendo que o EHCmeIM destaca-se em todos os ensaios em decorrência da concentração de flavonoides totais.

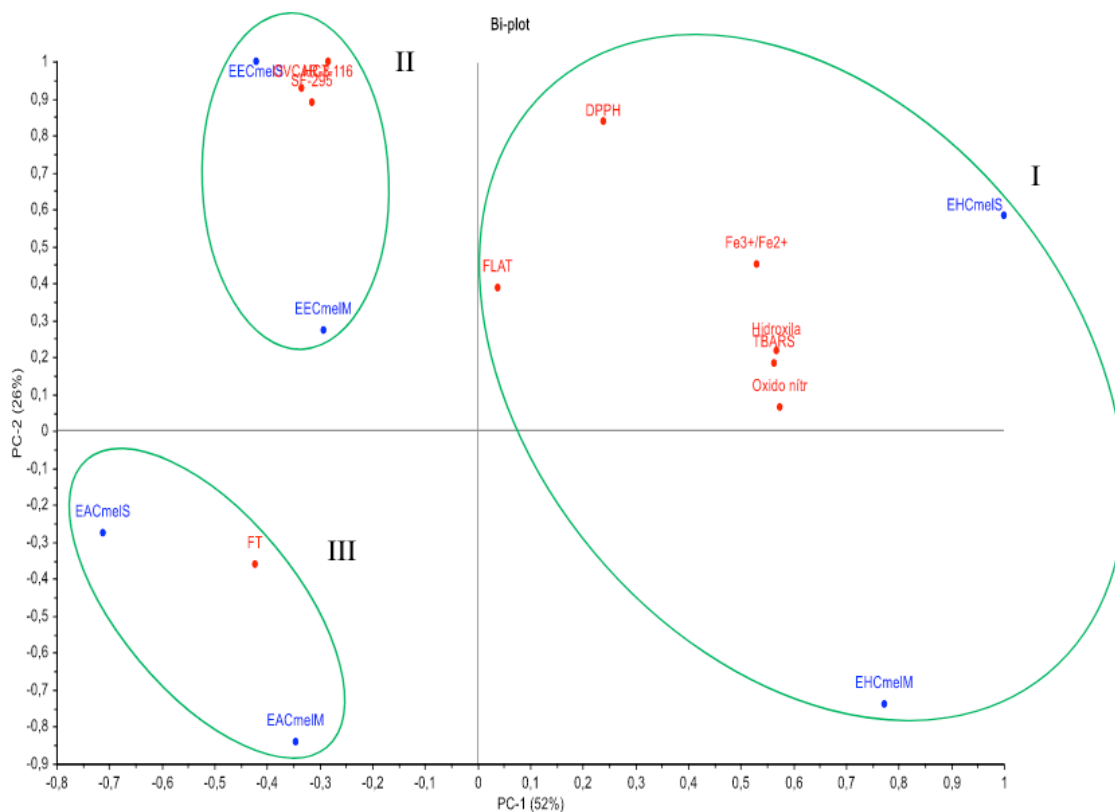


Gráfico 5 - Gráfico de *scores* obtido por PCA das triplicatas dos extratos das folhas de *C. mellifluum* coletadas no Cerrado Setentrional e Meridional

Os extratos etanólicos, grupo II (EECmelS e EECmelM) foram separados através da PC2 em função das atividades citotóxicas (HCT-116, OVCAR-8, SF-295), onde o EECmelS apresentou os maiores valores frente à três linhagens de células tumorais.

Em relação ao grupo III, os extratos aquosos (EACmelS e EACmelM) são separados pela PC2 em função do teor de fenóis totais (FT), apresentando o EACmelS com o maior teor.

4 | CONCLUSÃO

O extrato aquoso das folhas de *Combretum mellifluum* Eichler, do Cerrado Meridional (EACmelM) apresentou uma CE_{50} menor do que o padrão rotina e consequentemente, uma maior atividade antioxidante avaliada no ensaio do DPPH, entretanto, nos ensaios TBARS, OH e NO o EACmelS foi o mais ativo. Os extratos hexânicos da área meridional exibiram os maiores teores de flavonoides, provavelmente devido a presença de carotenoides que agem como interferentes. Os extratos hexânicos e etanólicos exibiram resultados positivos para o teste qualitativo de inibição da acetilcolinesterase. O extrato etanólico do Cerrado Sententrional mostrou-se fortemente ativo frente as três linhagens de células testadas, OVCAR-8

(carcinoma de ovário), HCT-116 (côlon – humano) e SF-295 (glioblastoma – humano).

A diferença observada nos resultados das atividades biológicas pode estar relacionada com a composição química, qualitativa e quantitativa, que embora os cromatogramas tenham se mostrado ora similares, ou não, há diferenças na concentração dos constituintes, influenciando sobre as diferenças nas atividades. As condições ambientais abióticas, por exemplo, provavelmente têm influência sobre essas diferenças, o que precisa ser mais intensamente averiguado.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J. R. G. S.; ARAÚJO, C. S.; PESSOA, C. Ó.; COSTA, M. P.; ALESSANDRA, A. G. M. Atividade antioxidante, citotóxica e antimicrobiana de *Annona vepretorum* Mart. (Annonaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 36. n.spe1, p. 258-264, 2014.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; MARCUS V. BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

ALVES, E.; KUBOTA, E. H. Conteúdo de fenólicos, flavonoides totais e atividade antioxidante de amostras de própolis comerciais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 1, p. 37-41, 2013.

BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 114-117, 2005.

CASTRO, A. A. J. F. **Comparação florístico-geográfica (Brasil) e fitossociologia (Piauí-São o Paulo) de amostras de cerrado**. 520p. 1994a. Tese (Doutorado). UNICAMP.

_____. Comparação florística de espécies do cerrado. **Silvicultura**, São Paulo, v. 15, n. 58, p. 16-18, nov./dez. 1994b.

CASTRO, A. A. J. F.; MARTINS, F. R.; FERNANDES, A. G. The woody flora of cerrado vegetation in the state of Piauí, northeastern Brazil. **Edinburgh Journal of Botany**, v. 55, n. 3, p. 455-472, 1998.

CASTRO, A. A. J. F.; MARTINS, F. R. Cerrados do Brasil e do Nordeste: caracterização, área de ocupação e considerações sobre a sua fitodiversidade. **Pesquisa em Foco**, v. 7, n. 9, p. 147-178, 1999.

DAWE, A.; PIERRE, S.; TSALA, D. E.; HABTEMARIAM, S. Phytochemical Constituents of *Combretum* Loefl. **Pharmaceutical Crops**, v. 4, p. 38-59, 2013.

DALBONE, C. A. C.; LANDO, R. L. Importância ecológica e evolutiva dos principais grupos de metabólitos secundários nas espécies vegetais. In: **Anais**. X Congresso de Educação do Norte Pioneiro. p. 396 -404. Jacarezinho, 2010.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES JR., V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88-95, 1961.

FERREIRA, E. L. F. MASCARENHAS, T. S.; OLIVEIRA, J. P. C.; CHAVES, M. H.; ARAÚJO, B. Q.; CAVALHEIRO, A. J. Phytochemical investigation and antioxidant activity of extracts of *Lecythispisonis* Camb. **Journal of Medicinal Plants Research**, v, 8, n. 8, p. 353-360, 2014.

- 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.
- GOTTLIEB, O. R.; BORIN, M. R. M. B. Natural Products Research in Brazil. **Ciência & Cultura**, v. 49 n. 5/6, p. 315-320, 1997b.
- GOTTLIEB, O. R.; BORIN, M. R. M. B. Shamanism *versus* Science in the Search for Useful Natural Products. In: VEROTTA, L. **Virtual Activity, Real Pharmacology: Different Approaches to the Search for Bioactive Natural Compounds**. Trivandrum: Research Signpost, 1997a.
- GOTTLIEB, O. R.; KAPLAN, M. A. C.; BORIN, M. R. M. B. **Biodiversidade**: um enfoque químico-biológico. Rio de Janeiro: UFRJ, 1996.
- KATERERE, D. R.; GRAY, A. I.; NASH, R. J.; WAIGH, R. D. Antimicrobial activity of pentacyclic triterpenes isolated from African Combretaceae. **Phytochemistry**, v. 63, p. 81-88, 2003.
- JOLY, A. B. **Botânica**: introdução à taxonomia. 13. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2002.
- LOPES, G. K. B.; SCHULMAN, H. M.; HERMES-LIMA, M. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions **Biochim Biophys Acta**, v. 1472, p. 142-152, 1999.
- LOIOLA, M. I. B.; SALES, M. F. Estudos taxonômicos do gênero *Combretum* Loefl. (Combretaceae R. Br.) em Pernambuco-Brasil. **Arquivos do Jardim Botânico**, v. 34, p. 173-188, 1996.
- MATOS, G. D.; TARLEY, C. R. T.; ARRUDA, M. A. Z.; FERREIRA, S. L. C. Análise exploratória em química analítica com emprego de quimiometria: PCA e PCA de imagens. **Review of Analytical Chemistry**, v. 6, p. 38-50, 2003.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983
- NOGUEIRA NETO, J. D.; SOUSA, D. P.; FREITAS, R. M. Avaliação do potencial antioxidante *in vitro* do nerolidol. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 1, p. 125-130, 2013.
- PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; SCAMPARINI, A. R. P.; AGUIAR, C. L. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência Rural**, v. 32, n. 6, p. 997-1003, 2002.
- PEIXOTO SOBRINHO, T. J. S. P.; GOMES, T. L. B.; CARDOSO, K. C. M.; AMORIM, E. C. Otimização de metodologia analítica para o doseamento de flavonoides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. **Química Nova**, v. 33, p. 288, 2010.
- RAMOS, L. A.; CAVALHEIRO, C. C. S.; CAVALHEIRO, E. T. G. Determinação de nitrito em águas utilizando extrato de flores. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 1114- 1120, 2006.
- RHEE, I. K.; MEENT, M. V.; INGGANINAN, K.; VERPOORTE, R. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. **Journal of Chromatography**, v. 915, p. 217-223, 2001.
- SILVA, E. G.; BEHR, G. A.; ZANOTTO-FILHO, A.; LORENZI, R.; PASQUALI, M. A. B.; RAVAZOLO, L. G.; BORDIGNON Jr., C. L.; SILVA, F. A.; 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, F. A. S. E.; AZEVEDO, C. A. V. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: **Anais**. World Congress on Computers in Agriculture, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

SINGHAL, M.; PAUL, A.; SINGH, H. P. Synthesis and reducing power assay of methyl semicarbazone derivatives. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 18, p. 121-127, 2014.

SOUSA, C. M. M.; ROCHA E SILVA, H.; VIEIRA-JR., G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, p. 351-355, 2007.

SOUSA, J. P. B.; FURTADO, N. A. J. C.; JORGE, R.; SOARES, A. E. E.; BASTOS, J. K. Perfis físico-químico e cromatográfico de amostras de própolis produzidas nas microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 85-93, 2007.

STACE, C. A. **Combretaceae: Terminalia and Buchenavia**. New York: The New York Botanic Garden Press, 2010.

Capítulo 3

ANÁLISE COMPARATIVA DE EXTRATOS DAS FOLHAS
DE *Terminalia actinophylla* MART. DE DUAS ÁREAS DE
CERRADO: POTENCIAL FARMACOLÓGICO



ANÁLISE COMPARATIVA DE EXTRATOS DAS FOLHAS DE *Terminalia actinophylla* MART. DE DUAS ÁREAS DE CERRADO: POTENCIAL FARMACOLÓGICO

Data de aceite: 02/12/2019

Ruth Raquel Soares de Farias

Faculdade de Ensino Superior do Piauí - FAESPI
Teresina-PI

Erika Thalyta Veras Pereira

Universidade Federal de São Carlos -UFSCar São
Carlos-SP

Mariana Helena Chaves

Universidade Federal do Piauí, UFPI Teresina-PI

Paulo Michel Pinheiro Ferreira

Universidade Federal do Piauí, UFPI Teresina-PI

Chistiane Mendes Feitosa

Universidade Federal do Piauí, UFPI Teresina-PI

Claudia do Ó Pessoa

Universidade Federal do Ceará, UFC Fortaleza-
CE

George Laylson da Silva Oliveira

Instituto Federal de Educação Ciência e
Tecnologia de Mato Grosso, IFMT, Brasil

Rusbene Bruno Fonseca de Carvalho

Universidade Federal do Piauí, UFPI Teresina-PI

Jéssica Pereira Costa

Universidade Federal do Piauí, UFPI Teresina-PI

Antonio Alberto Jorge Farias Castro

Universidade Federal do Piauí, UFPI Teresina-PI

Márcia Denise Alves Veras

Universidade Federal do Piauí, UFPI Teresina-PI

Carlos Humberto Aires Matos Filho

Universidade Federal do Piauí, UFPI Teresina-PI

RESUMO: O trabalho teve como objetivo investigar o potencial farmacológico dos extratos hexânico, etanólico e aquoso das folhas da espécie *Terminalia actinophylla* Mart. de duas regiões do Cerrado: Setentrional e Meridional do estado do Piauí. O perfil químico dos extratos foi obtido por cromatografia líquida de alta eficiência. A atividade antioxidante foi avaliada pelos ensaios dos radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH), hidroxila e óxido nítrico, substâncias reagentes ao ácido tiobarbitúrico e redução do Fe^{3+} à Fe^{2+} . O teor de fenóis totais foi determinado pelo método de Folin–Ciocalteu e de flavonoides totais por redução com cloreto de alumínio. A atividade acetilcolinesterásica foi avaliada por cromatografia em camada delgada utilizando como revelador o reagente de Ellman. A citotoxicidade dos extratos foi investigada pelo método MTT em relação a três linhagens de células tumorais humanas (ovário, glioblastoma e cólon). A determinação do fator de proteção solar (FPS) foi realizada por método espectrofotométrico no intervalo de 260 a 400 nm. Os extratos etanólicos e aquosos de *T. actinophylla* apresentaram atividade citotóxica em pelo menos uma das linhagens testadas. A espécie se destaca por apresentar atividade antioxidante e altos teores de fenóis e flavonóides totais. Todos os extratos de *T. actinophylla* do Cerrado Meridional demonstraram atividade anticolinesterásica.

Os testes biológicos realizados, o perfil cromatográfico e a análise dos componentes principais demonstram que há uma diferença no potencial químico e biológico dos espécimes. Além de disso, sugere que a planta tem um promissor uso como antioxidante, anticolinesterásica e fotoprotetora.

PALAVRAS-CHAVE: Antioxidante. Fotoproteção. Biodiversidade. Cerrados do Nordeste.

COMPARATIVE ANALYSIS OF EXTRACTS OF THE LEAVES OF *Terminalia actinophylla* FROM TWO CERRADO AREAS: PHARMACOLOGICAL POTENTIAL

ABSTRACT: This study aimed to investigate the pharmacological potential of hexane, ethanol and aqueous extracts from leaves of the species *Terminalia actinophylla* Mart. of two Piauí state cerrado regions: Northern and Southern. The chemical profile of the extracts was obtained by high-performance liquid chromatography (HPLC). The antioxidant activity was evaluated by the test of the radicals 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), hydroxyl and nitric oxide, reactive substances to thiobarbituric acid (TBARS), and reduction of Fe³⁺ to Fe²⁺. The determination of total phenolic and flavonoid content was performed by the method of Folin-Ciocalteu and by reduction with aluminum chloride, respectively. The anticholinesterase activity was assessed by thin layer chromatography by using the Ellman reagent as revealer. The cytotoxicity of the extracts was investigated by MTT method against three strains of human tumor cells (ovarian, glioblastoma and colon). The determination of the sun protection factor (SPF) was performed by spectrophotometric method in the range of 260 to 400 nm. The ethanol and aqueous extracts of *T. actinophylla* exhibited cytotoxic activity in at least one of the three strains tested. The species stands out for its antioxidant activity, and its total phenolic and flavonoid content. All extracts of *T. actinophylla* from southern cerrado demonstrated acetylcholinesterase activity. The biological tests performed, the chromatographic profile and the analysis of the main components showed that there is a difference in the chemical and biological potential of specimens. It is also suggested that the plant has a promising use as antioxidant, anticholinesterasic, and sunscreen.

KEYWORDS: Antioxidant. Photoprotection. Biodiversity. Cerrados of Northeast.

1 | INTRODUÇÃO

Os cerrados marginais do Piauí, que segundo Castro (1994 a, b) e Castro e Martins (1999) caracterizam-se por possuir uma flora “areal” e é diferenciada por responder à deficiência hídrica anual dos solos, a padrões lati-altitudinais de abundância de espécies e a baixas cotas altimétricas. Além do mais, localizam-se em áreas de tensão ecológica que fazem parte do maior domínio fitoecológico do Estado (RIVAS, 1996), possuindo provavelmente maior fragilidade ecológica e susceptibilidade à especiação.

Fatores ambientais como: sazonalidade, ritmo circadiano, temperatura,

disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes, altitude e poluição atmosférica, não apenas interferem na flora dos cerrados, mas também influenciam o conteúdo de metabólitos secundários, porém estudos que enfatizam estes fatores são restritos a grupo de espécies, das quais muitas são de importância comercial e “que sofreram pressões seletivas antrópicas”. Os resultados desses estudos nem sempre são representativos para plantas selvagens e de ambientes diferentes das regiões temperadas (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Para sustentabilidade de um país, faz-se necessário uma política consistente de educação, ciência, tecnologia e inovação, “sustentada na preservação da natureza, na biodiversidade e na exploração racional de fontes naturais necessárias para alimentação, avanço social e econômico, num cenário que assegura a manutenção da saúde e a cura de doenças” (BRAZ FILHO, 2010).

A espécie nativa escolhida para esta pesquisa foi *Terminalia actinophylla* Mart. denominada popularmente por tanimbuca amarela, capitão, chapada e mussambê. Distribui-se geograficamente no Brasil nas regiões Norte (TO), Nordeste (BA, MA, PE, PI) e Centro-Oeste (GO). Não possui outra sinonímia. Na medicina popular é utilizada para tratamento de distúrbios intestinais e processo de cicatrização (ABREU et al., 2010). O extrato aquoso das folhas possui atividade antimutagênica (PÁDUA et al., 2013).

Considerando a importância de plantas medicinais para o desenvolvimento de novos fármacos bem como as atividades descritas para plantas do gênero *Terminalia* L., o trabalho teve como objetivo investigar o potencial químico e farmacológico de extratos das folhas da espécie *T. actinophylla*, provenientes de duas regiões de Cerrado (Setentrional e Meridional).

2 | MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Preparação dos extratos

As folhas da espécie *Terminalia actinophylla* Mart. foram coletadas no município de Jatobá do Piauí - PI (04°51'48.6" S, 42°04'19,6" W e 90 m.n.m.) e Bom Jesus - PI (09°18'44.0" S, 44°32'39.7" W e 367 m.n.m.), em janeiro de 2012.

A espécie foi determinada botanicamente pela Dra. Maria Iracema Bezerra Loiola, especialista de Combretaceae, da Universidade Federal do Ceará e recebeu os números TEPB 27.959 e TEPB 28.349, que se encontram incluídos no acervo do Herbário Graziela Barroso (TEPB/UFPI).

As folhas foram desidratadas a temperatura ambiente em local arejado, em seguida moídas, em moinho de facas, e submetidas ao procedimento de maceração por três vezes, com hexano, etanol e água sucessivamente. Cada extração tinha a duração de 72 horas. O solvente orgânico foi removido por destilação em

rotaevaporador. Após destilação do solvente orgânico, a água residual foi removida por liofilização.

O rendimento dos extratos foi calculado pela expressão:

Rendimento (%) = (massa do extrato/massa do material vegetal) x 100 (SOUSA et al., 2007). A Tabela 1 mostra a massa e o rendimento dos extratos.

Extratos	Massa das folhas (g)	Massa do extrato(g)	Rendimento do extrato total (%)
EHTactS		13,8	1,6
EETactS	862,7	57,9	6,7
EATactS		44,6	5,2
EHTactM		7,8	0,7
EETactM	1077,00	45,8	4,3
EATactM		27,7	2,6

Tabela 1 – Massa das folhas, massa e rendimento dos extratos hexânicos, etanólicos e aquosos de *Terminalia actinophylla*

EHTactS: Extrato hexânico de *Terminalia actinophylla* do Cerrado Setentrional; EETactS: Extrato etanólico de *T. actinophylla* do Cerrado Setentrional; EATactS: Extrato aquoso de *T. actinophylla* do Cerrado Setentrional; EHTactM: Extrato hexânico de *T. actinophylla* do Cerrado Meridional; EETactM: Extrato etanólico de *T. actinophylla* do Cerrado Meridional; EATactM: Extrato aquoso de *T. actinophylla* do Cerrado Meridional.

2.2 Atividade antioxidade

2.2.1 Preparo das soluções

A solução estoque de DPPH a 40 mg L⁻¹ foi preparada dissolvendo-se 0,004 g de DPPH em 100 mL de MeOH. A amostra (12,5 mg) foi dissolvida em MeOH, obtendo-se uma solução estoque de 250 mg L⁻¹. A partir da solução estoque das amostras, foram preparadas diluições nas concentrações de 25, 50, 100, 150, 200 e 250 mg L⁻¹. O flavonoide rutina foi utilizado como controle positivo.

As medidas de absorvâncias foram realizadas no comprimento de onda de 516 nm. A equação da curva de calibração do DPPH foi de $C = 33,227A + 1,0601$, onde C é a concentração de DPPH no meio e A é a absorvância, com coeficiente de correlação linear $r = 0,9997$.

As medidas de absorvâncias das misturas reacionais (0,3 mL da solução da amostra + 2,7 mL da solução estoque de DPPH a 40 mg.L⁻¹) e do branco (0,3 mL da solução da amostra + 2,7 mL de MeOH) foram realizadas no comprimento de onda ($\lambda_{\text{máx}}$) de 516 nm, no 1°, 5°, 10°, 20° e 30° minutos de reação (SOUSA et al., 2007).

Os valores de absorvância da amostra nas concentrações de 25, 50, 100, 150, 200 e 250 mg L⁻¹ no tempo de 30 minutos ($\lambda_{\text{máx}}$ 516 nm) foram convertidos em porcentagem de atividade antioxidante (%AA).

2.2.2 Determinação do nível de peroxidação lipídica (TBARS)

Esse método foi avaliado conforme Silva e colaboradores (2007). As amostras foram analisadas nas concentrações 0,9; 1,8; 3,6; 5,4 e 7,2 $\mu\text{g/mL}$. O veículo (tween 80 a 0,05%, dissolvido em salina 0,9%) foi utilizado como controle negativo e o Trolox como controle positivo, que também foi avaliado nas mesmas concentrações da amostra. As leituras de absorvâncias foram lidas à 532 nm em espectrofotômetro *Perkin Elmer Precissely Lambda 25 UV/Vis*. Os resultados foram expressos como porcentagem de TBARS formada a partir do AAPH (controle induzido).

2.2.3 Determinação do nível de inibição da produção do radical hidroxila

O ensaio do radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$) foi avaliado a partir da reação de Feton como descrito por Lopes, Schulman e Hermes-Lima (1999). As amostras foram analisadas nas concentrações 0,9; 1,8; 3,6; 5,4 e 7,2 $\mu\text{g/mL}$ e as absorvâncias foram medidas à 532 nm. O Trolox, nas mesmas concentrações da amostra, foi utilizado como controle positivo. Os resultados foram expressos como equivalentes do malondialdeído formado por Fe^{2+} e H_2O_2 .

2.2.4 Determinação do potencial sequestrador do radical óxido nítrico

A quantificação do óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) produzido foi realizada a partir da decomposição espontânea do nitroprussiato de sódio (NPS) em tampão fosfato 20 mM (pH 7,4) de acordo com a metodologia descrita por Nogueira Neto, Sousa e Freitas (2013) utilizando reagente de Griess (GREEN et al., 1982). As amostras foram analisadas nas concentrações de 0,9; 1,8; 3,6; 5,4 e 7,2 $\mu\text{g/mL}$. A absorvância do cromóforo foi medida a 540 nm. A porcentagem de inibição do óxido nítrico gerado foi medida por meio da comparação dos valores de absorvância do controle negativo (NPS 10 mM e veículo) e das amostras. O Trolox, nas mesmas concentrações da amostra, foi utilizado como controle positivo. Os resultados foram expressos em porcentagem de nitrito formado por NPS isoladamente.

2.2.5 Avaliação do potencial redutor

O potencial redutor dos extratos foi avaliado pela redução direta do ferricianeto de potássio (III) $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$ à ferrocianeto de potássio (II) $[\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6]$, seguindo a metodologia descrita por Singhal, Paul e Singh (2014), com modificações. As amostras foram testadas nas concentrações de 0,9, 1,8, 3,6, 5,4 e 7,2 $\mu\text{g/mL}$, com 1 mL de ferrocianeto de potássio 1% e 1 mL de tampão fosfato de sódio (0,2 M, pH 6,6). A mistura reacional foi incubada a 50 °C durante 20 minutos, e em seguida adicionou-se 1 mL de ácido tricloroacético 10%. A mistura resultante foi centrifugada 3000 rpm

durante 10 minutos. Ao sobrenadante da mistura reacional foi acrescentado 1 mL de água destilada e 0,5 mL de cloreto férrico (FeCl_3) 0,1%. As leituras das absorvâncias foram medidas a 700 nm contra o branco que continham apenas tampão fosfato. O mesmo procedimento experimental foi utilizado com o controle positivo Trolox.

2.3 Avaliação do teor de fenóis totais

O conteúdo de fenóis totais (FT) dos extratos hexânicos, etanólicos e aquosos das folhas da espécie *Terminalia actinophylla* Mart. foi determinado pelo método Folin-Ciocalteu com modificações (BONOLI et al., 2004; FOLIN; CIOCALTEAU, 1927). Uma alíquota de 1000 mg L^{-1} da solução metanólica dos extratos hexânicos e aquosos das folhas de *T. actinophylla* foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL, para o extrato etanólico transferiu-se apenas 50 μL na mesma concentração de 1000 mg L^{-1} . Em seguida, adicionaram-se 500 μL do reagente Folin-Ciocalteu, 5 mL de água destilada e agitou-se por 1 minuto. Após este tempo, adicionaram-se 2 mL de Na_2CO_3 15% e agitou-se por 30 segundos. O volume dos balões volumétricos foi completado com água destilada. Preparou-se um branco, utilizando metanol. As absorvâncias das amostras foram medidas após 2 horas de reação, no comprimento de onda ($\lambda_{\text{máx}}$) 750 nm.

Os teores de fenóis totais (FT) foram determinados usando curva padrão de ácido gálico na faixa de 0,1-2,5 mg L^{-1} e os valores foram expressos em equivalente de ácido gálico por grama de amostra (mg de EAG/g de amostra). A equação da reta foi $A = 0,1185C - 0,0453$, onde A é a absorvância e C a concentração, com coeficiente de correlação linear $r = 0,999$. As análises foram realizadas em triplicata.

2.4 Avaliação do teor de flavonoides totais

Inicialmente, a solução estoque das amostras foi preparada dissolvendo-se 10 mg do extrato em 10 mL de MeOH obtendo-se a concentração de 1000 $\mu\text{L/mL}$. Uma alíquota de 300 μL desta solução foi transferida para balões de 10 mL e acrescido 0,24 mL de ácido acético, 4 mL da solução metanólica de piridina 20% e 1 mL do reagente de cloreto de alumínio (50 mg mL^{-1}). Finalmente a solução teve seu volume acertado para 10 mL com água destilada. Preparou-se o branco em paralelo. Após 30 minutos, a absorvância das amostras foi medida a 420 nm utilizando-se cubetas de quartzo.

O teor de flavonoides totais (FLAT) foi determinado usando uma curva analítica de rutina na faixa de 3-21 mg L^{-1} e os valores foram expressos em miligramas de equivalente de rutina por grama de extrato (mg de ER/g de amostra). A equação da reta foi: $A = 0,02618C - 0,00717$, onde A é a absorvância e C a concentração, com um coeficiente de correlação linear de $r = 0,999$. Todas as análises foram realizadas

em triplicata (n=3).

2.5 Ensaio em Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA) para detecção de inibidores da AChE em extratos

O ensaio para detecção de inibição qualitativa da enzima AchE foi realizado com os extratos etanólicos e hexânicos da espécie *Terminalia actinophylla* Mart. dissolvidos em metanol para se obter uma concentração de 10 mg/mL. Então 1,5-2,5 µL de cada amostra foi aplicada em placa cromatográfica de gel de sílica, eluída em clorofórmio/metanol (9:1). Após a placa ser desenvolvida a atividade inibitória foi detectada utilizando revelador baseado no método de Ellman. A placa foi pulverizada com DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico)/ATCI (Iodeto de acetiltiocolina) (1 mM DTNB e 1 mM ATCI em tampão) até que houvesse saturação com o reagente. Depois de seca por 3-5 minutos pulverizou-se com 5 units/mL da enzima. Finalmente, o teste positivo pôde ser observado através das placas que se apresentaram amarelas e com manchas brancas depois de 5 minutos demonstrando assim inibição comparando-se com o padrão, cafeína (ELLMAN, et al., 1961; INGKANINAN et al., 2003; INGKANINAN et al., 2000; RHEE et al.; 2001).

2.6 Atividade citotóxica

A citotoxicidade dos extratos hexânicos, etanólicos e aquosos das folhas de *Terminalia actinophylla* Mart. foi avaliada pelo método MTT em relação a três linhagens de células tumorais humanas: OVCAR (carcinoma de ovário), SF-295 (glioblastoma humano) e HCT-116 (cólon – humano) cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA). Todas as linhagens foram cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂ (BURIOL et al., 2009).

Os extratos foram dissolvidos em DMSO puro estéril para a concentração estoque de 10 mg/mL.

As células foram plaqueadas em placas de 96 poços nas concentrações de 1 x 10⁵ célmL⁻¹. Em seguida, a amostra (50 µg L⁻¹) foi adicionada à placa e posteriormente, incubada por 69 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37 °C. As frações foram centrifugadas e o sobrenadante removido. Em seguida, foram adicionados 200 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium) e as placas foram incubadas por 3h. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro a 595 nm, após dissolução do precipitado com 150 µL de DMSO. O controle positivo utilizado foi a doxorrubicina.

Os extratos foram testados em duplicata. Os valores dos resultados e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) foram calculados a partir de regressão não-linear utilizando o programa *Prism*, versão 3.0 (*GraphPad Software*).

2.7 Perfil químico dos extratos em HPLC

Os perfis cromatográficos foram obtidos através de análise em HPLC, *Shimadzu prominence system* com sistema binário de bombas LC-6AD, detector UV SPD-20A e injetor manual. A coluna utilizada foi a C18 Shim-pack CLCDS(M) de 250 x 4,6 mm e partícula de 5 μm . As amostras analisadas foram submetidas a um tratamento, utilizando membrana filtrante de 0,45 μm . A eluição foi realizada com MeOH/H₂O, em modo gradiente (5 \square 100% em 60min), fluxo de 1,0 mL/min, a temperatura ambiente (25 °C) e injeção de 20 μL de solução do extrato em uma concentração de 5,0 mg/mL. Os cromatogramas foram monitorados a 254 nm.

2.8 Determinação do Fator de Proteção Solar

Para a determinação do fator de proteção solar (FPS) preparou-se soluções nas concentrações de 5, 25, 50, 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dos extratos hexânicos, etanólicos e aquosos e realizou-se uma varredura no espectrofotômetro *Perkin Elmer Precissely Lambda 25 UV/VIS*, na faixa entre 260 a 400 nm, em intervalos de 5 nm. Utilizando cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico e etanol como branco (VIOLANTE, et al., 2009).

O cálculo do FPS é realizado de acordo com a equação desenvolvida por Mansur et al. (1986): $\text{SPF}_{\text{spectrophotometric}} = \text{CF} \times \sum \text{EE}(\lambda) \times \text{I}(\lambda) \times \text{Abs}(\lambda)$ (3)

Onde:

EE (λ) é o espectro do efeito eritema,

I (λ) é o espectro de intensidade solar,

Abs (λ) é a Absorbância do extrato e

CF é o fator de correção, que é igual a 10

Sayre et al., 1979 determinou os valores de EE (λ) x I (λ), esses valores são constantes.

Os dados obtidos foram analisados usando *software* computacional *OriginPro*, versão 8.0. Os valores de FPS foram calculados por regressão linear (OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2013).

2.9 Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), compreendendo duas localidades de coleta (Cerrado Setentrional e Cerrado Meridional), e uma parte da planta (folhas), perfazendo um fatorial 2 x 1, num total de 6 amostras de extratos, com três repetições. Os valores da média das três repetições ($n=3$) \pm desvio padrão da média foram calculados em planilha Excel.

Os resultados das atividades farmacológicas dos extratos das folhas de *Terminalia actinophylla* Mart. foram analisados estatisticamente por análise da

variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade pelo programa ASSISTAT, versão 7.7 (2009), licenciado pela Universidade Federal de Campina Grande. Para o cálculo das CE_{50} utilizou-se os programas *Microcal Origin 8.0* e/ou *IBM SPSS Statistic 20*.

Na análise multivariada, os resultados obtidos para todas as atividades farmacológicas foram tratados por meio da Análise de Componentes Principais (PCA), com auxílio do software programa Unscrambler® X, versão 10.2 (Camo, Noruega), onde foi possível a comparação dos extratos das folhas de *T. actinophylla*, verificando-se as possíveis similaridades e/ou diferenças.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Atividade sequestrante de radicais livres DPPH

Os gráficos 1 e 2 mostram que os percentuais de atividade antioxidante (AA) para os extratos etanólicos e aquoso da espécie *Terminalia actinophylla* Mart. coletadas no Cerrado Setentrional e Meridional, e do controle positivo rotina são dependentes da concentração, entretanto isto não foi claramente observado para os extratos hexânicos.

Os extratos etanólicos e aquosos das folhas de *T. actinophylla* apresentaram significativa atividade antioxidante com CE_{50} variando de $30,72 \pm 1,25$ à $34,57 \pm 0,92$ $\mu\text{g/mL}$, sendo o EETactM o mais ativo. Esses extratos foram superiores à rotina, um flavonoide utilizado como controle positivo que exibiu uma CE_{50} igual a $47,08 \pm 4,65$ $\mu\text{g/mL}$.

Os resultados deste trabalho demonstram uma maior atividade antioxidante para os extratos das folhas de *T. actinophylla* quando comparados aos determinados por Sousa et al. (2007) para plantas do mesmo gênero, *T. brasiliensis* ($CE_{50} = 44,53 \pm 1,09$ $\mu\text{g/mL}$) e *T. fagifolia* ($CE_{50} = 42,23 \pm 1,72$ $\mu\text{g/mL}$) coletadas no município de Nazaré do Piauí.

Os extratos etanólicos e aquosos das folhas de *Terminalia actinophylla* Mart. demonstraram atividade antioxidante semelhantes, porém as folhas da espécie, objeto deste estudo, coletadas no Cerrado Meridional se destacaram, o que pode ser observado pelos baixos valores de CE_{50} registrados para esse Cerrado.

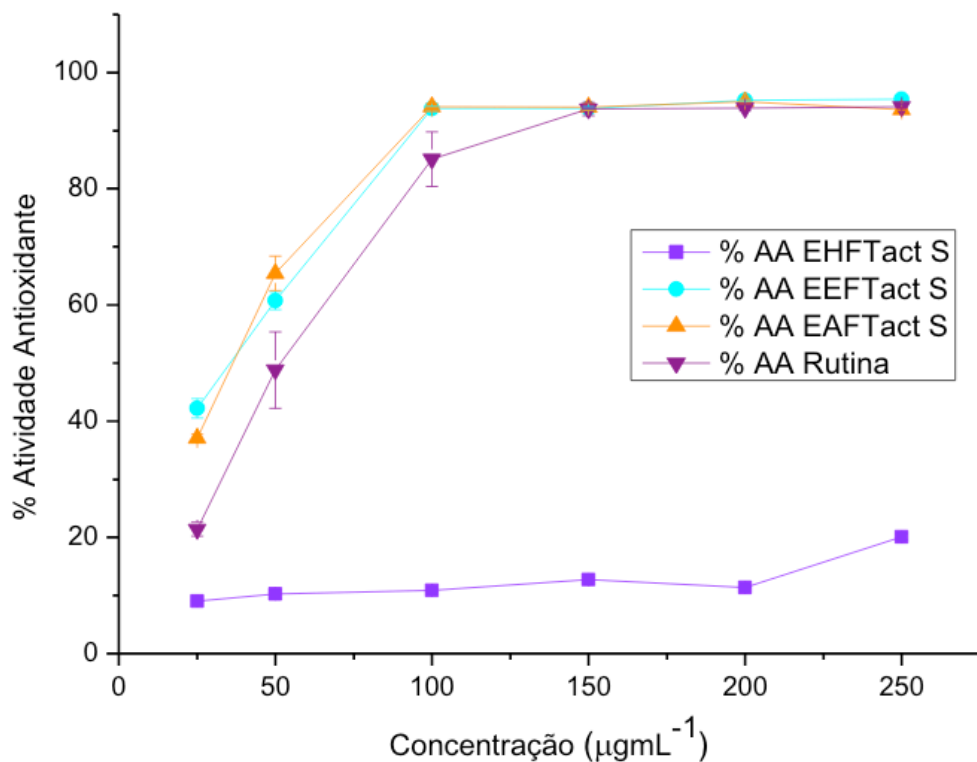


Gráfico 1 - Porcentagem de atividade antioxidante dos extratos hexânico (EHFTactS), etanólico (EEFTactS) e aquoso (EAFTactS) das folhas de *Terminalia actinophylla* do Cerrado Setentrional e do padrão Rutina.

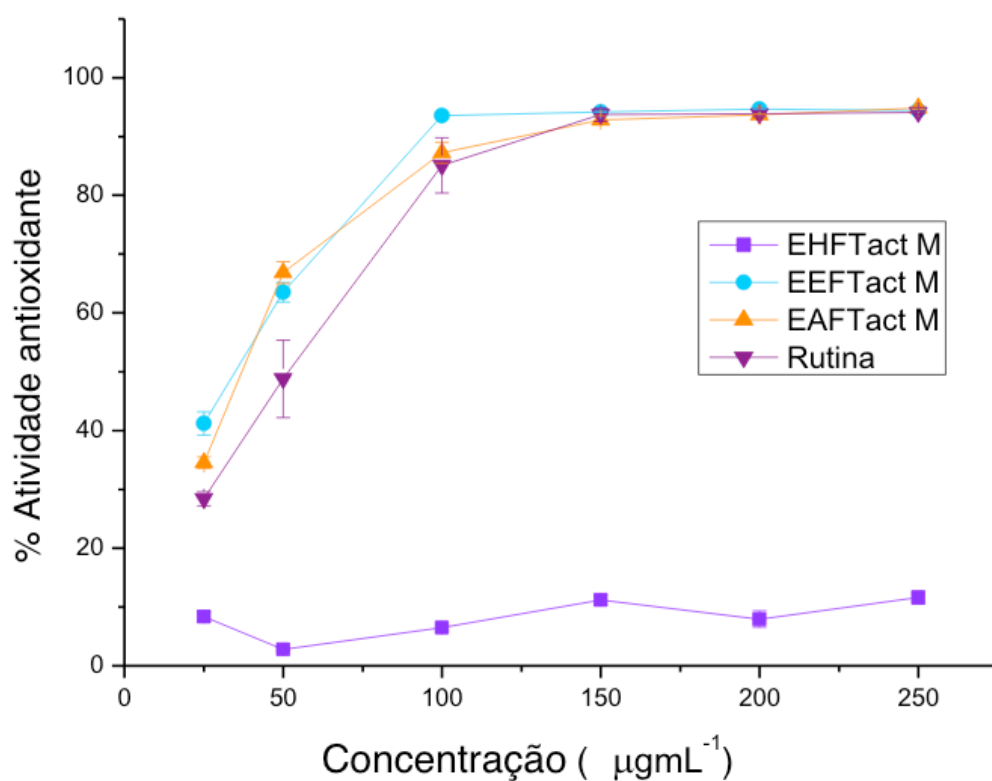


Gráfico 2 - Porcentagem de atividade antioxidante dos extratos hexânico (EHFTactM), etanólico (EEFTactM) e aquoso (EAFTactM) das folhas de *Terminalia actinophylla* do Cerrado Meridional e do padrão Rutina.

3.1.2 Determinação de inibição da lipoperoxidação (TBARS)

Trata-se de um ensaio para a avaliação da atividade antioxidante, cuja função é determinar espécies que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBA). Este teste avalia a formação de produtos finais da lipoperoxidação, como o malondialdeído (MDA), que é citotóxico e pode lesar o DNA (ESTERBAUER, 1993).

Os extratos EETactS ($0,514 \pm 0,08$) e EATactS ($0,38 \pm 0,07$) apresentaram os maiores potenciais antioxidativos, porém menores em relação ao controle positivo Trolox ($0,23 \mu\text{g/mL}$), destacando-se o EATactS ($CE_{50} = 0,38 \pm 0,07 \mu\text{g/mL}$).

A ordem decrescente da atividade antioxidante no ensaio TBARS para os extratos de *Terminalia actinophylla* foi: EATactS > EETactS > EETactM > EATactM > EHTactM > EHTactS (Tabela 2).

3.1.3 Avaliação do potencial antioxidante contra a formação do radical hidroxila

O presente ensaio quantifica o produto de degradação da 2-desoxirribose, o malonaldeído (MDA), por meio da sua condensação com ácido tiobarbitúrico (TBA). Nesta reação foi avaliado o efeito dos extratos de *T. actinophylla* contra a produção do radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$).

Nas concentrações testadas ($0,9$; $1,8$; $3,6$; $5,4$ e $7,2 \mu\text{g/mL}$) o EETactS ($CE_{50} = 0,35 \pm 0,08 \mu\text{g/mL}$), e o EATactS ($CE_{50} = 0,67 \pm 0,09 \mu\text{g/mL}$), demonstraram maior poder antioxidante, sendo superior ao controle positivo, Trolox. Entretanto os mesmos extratos, obtidos da espécie coletada no cerrado Meridional. EETactM e EATactM, não se mostraram tão ativos, apresentando CE_{50} igual a $4,00 \pm 0,38$ e $1,10 \pm 0,17 \mu\text{g/mL}$ respectivamente, valores do controle positivo (Tabela 2).

3.1.4 Avaliação do potencial antioxidante contra a formação do radical óxido nítrico

O radical nitrito em excesso, pode estar envolvido no desenvolvimento de inúmeras patologias, sendo importante na investigação de substâncias capazes de sequestrar, ou seja, reduzir esse radical (SANTANA et al., 2013).

Os resultados obtidos, apresentados na Tabela 2 demonstram que na composição dos extratos das folhas de *T. actinophylla*, pode haver a presença de substâncias antioxidantes com capacidade de reduzir o nitrito, produzido a partir do nitroprussiato de sódio em todas as concentrações testadas ($0,9$; $1,8$; $3,6$; $5,4$ e $7,2 \mu\text{g/mL}$).

Pôde-se observar alta atividade antioxidante para os extratos aquosos e etanólicos de ambas áreas, quando comparado com o controle positivo Trolox ($CE_{50} = 3,23 \mu\text{g/mL}$) que é um potente antioxidante, análogo da vitamina E utilizado como controle positivo neste ensaio.

A CE_{50} encontrada para o EATactS se destacou com maior potencial antioxidante ($CE_{50} = 0,39 \pm 0,07 \mu\text{g/mL}$), seguida da ($CE_{50} = 0,52 \pm 0,097 \mu\text{g/mL}$) para o EETactS, demonstrando que os extratos das folhas de *Terminalia actinophylla* Mart. coletadas no Cerrado Setentrional se sobressaem em atividade antioxidante, os extratos hexânicos dos dois cerrados corresponderam as menores atividades.

3.1.5 Avaliação do potencial redutor

A atividade antioxidante incluindo o poder redutor para os extratos das folhas de *T. actinophylla* são apresentados na Tabela 2.

Os resultados do poder redutor foram expressivamente inferiores em relação ao controle positivo Trolox utilizado nesse ensaio experimental ($CE_{50} = 2,13 \mu\text{g/mL}$).

Níveis de poder redutor mais elevados são observados nos extratos obtidos com solvente etanol, de ambas áreas (EETactS e EETactM, ambas com o mesmo valor de $CE_{50} = 9,14 \mu\text{g/mL}$).

Extrato/ Ensaio antioxidante	DPPH	Hidroxila	Oxido nítrico	TBARS	Fe ³⁺ /Fe ²⁺
EHTactS	ND	3,43±0,19	3,49±0,19	3,62±0,20	9,88±0,21
EETactS	33,87±0,44	0,35±0,08	0,52±0,097	0,514±0,08	9,14±0,16
EATactS	34,57±0,92	0,67±0,09	0,39±0,07	0,38±0,07	9,16±0,18
EHTactM	ND	3,58±0,18	3,35±0,20	3,39±0,18	10,17±0,17
EETactM	30,72±1,25	4,00±0,38	0,70±0,16	1,009±0,16	9,14±0,15
EATactM	33,01±0,60	1,10±0,17	0,92±0,18	1,19±0,18	9,181±0,13
Rutina	47,08	-	-	-	-
Trolox	-	0,76	3,23	0,23	2,13

Tabela 2 – Atividade antioxidante (CE_{50}) dos extratos hexânico, etanólico e aquoso de *Terminalia actinophylla* do Cerrado Setentrional e Meridional do estado do Piauí

EHTactS: Extrato hexânico de *Terminalia actinophylla* do Cerrado Setentrional; EETactS: Extrato etanólico de *T. actinophylla* do Cerrado Setentrional; EATactS: Extrato aquoso de *T. actinophylla* do Cerrado Setentrional; EHTactM: Extrato hexânico de *T. actinophylla* do Cerrado Meridional; EETactM: Extrato etanólico de *T. actinophylla* do Cerrado Meridional; EATactM: Extrato aquoso de *T. actinophylla* do Cerrado Meridional; TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

3.2 Fenóis totais (FT)

Os teores de fenóis totais (FT), expressos em mg de equivalente de ácido gálico (EAG) dos extratos hexânicos, etanólicos e aquosos das folhas de *T. actinophylla* estão apresentados na Tabela 3.

Os teores de fenóis totais mostram que os extratos etanólico e aquoso dos espécimes do Cerrado Meridional (EETactM e EATactM) não apresentam diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, ao contrário do que acontece com os extratos do Cerrado Setentrional.

O extrato obtido com solvente etanol (EETactS) representou o maior teor de fenóis totais (FT), com $645,24 \pm 25,23$ mg EAG/g, seguido pelo EETactM ($513,36 \pm 6,41$ mg EAG/g) e EATactM ($505,25 \pm 2,27$ mg EAG/g).

Teores de FT altos foram obtidos, também, por Sousa et al. (2007), para *Terminalia brasiliensis* Cambess. ($666,90 \pm 10,92$ mg EAG/g) e *T. fagifolia* Mart. & Zucc. ($439,38 \pm 3,15$ mg EAG/g).

Os maiores valores do teor de fenóis totais computados neste estudo demonstram uma correlação positiva com a atividade antioxidante nos ensaios com radicais de DPPH, hidroxila, óxido nítrico e TBARS, corroborando com o esperado por Ferreira et al. (2014) que afirmam que compostos fenólicos são potenciais sequestradores de radicais livres, portanto antioxidantes.

3.3 Flavonoides totais (FLAT)

Na Tabela 3 estão apresentados os teores de flavonoides totais (FLAT), expressos em mg de equivalente de rutina (ER) por grama de extrato dos extratos hexânicos, etanólicos e aquosos das folhas de *T. actinophylla* Mart.

Os teores de flavonoides totais (FLAT) dos extratos variaram de $66,8 \pm 0,77$ a $716,10 \pm 15,47$, que correspondem aos extratos aquoso e etanólico para o Cerrado Setentrional.

Para o Cerrado Setentrional, o EETactS apresentou-se como o mais rico em teores totais de flavonoides, enquanto que para o Cerrado Meridional o destaque cabe ao EHTactM, revelando comportamento atípico para este último, pois extratos hexânicos geralmente são constituídos por substâncias alifáticas de baixa polaridade, dentre estas os carotenoides, que absorvem no mesmo comprimento de onda do teste realizado (420 nm) sendo assim um interferente.

Com a exclusão do extrato hexânico devido ao seu comportamento atípico descrito acima, os resultados para o EETactS não apresentam correlação positiva com a atividade antioxidante, haja visto que esse extrato sempre se mantém mais ativo nos ensaios antioxidantes (hidroxila, óxido nítrico e TBARS), isso sugere que a atividade antioxidante é decorrente de outra classe de substâncias. Contudo os teores de flavonoides totais possuem correlação com a altitude em que a espécie foi coletada, corroborando que quanto maior a altitude, maior a produção de flavonoides. Nesse contexto, o EETactS foi do espécime coletado no município de Bom Jesus – PI, com altitudes registradas de 367 m, mostrando que a espécie desenvolve alta proteção contra a incidência de raios ultravioletas (UV-B).

Aplicando-se o teste de médias, todos os extratos das folhas de *T. actinophylla* apresentaram diferenças significativas ao nível de 5% de probabilidade.

Extrato	FT - mg de EAG/g Extrato	FLAT - mg de ER/g Extrato
EHTactS	69,46±1,43 ^e	124,57±2,23 ^d
EETactS	645,24±25,23 ^a	716,10±15,47 ^a
EATactS	290,77±3,64 ^c	66,8±0,77 ^e
EHTactM	147,71±2,49 ^d	379,33±17,13 ^b
EETactM	513,36±6,41 ^b	133,35±2,79 ^d
EATactM	505,25±2,27 ^b	172,18±2,85 ^c

Tabela 3 – Teores de fenóis totais (FT) e flavonoides totais (FLAT) dos extratos hexânicos, etanólicos e aquosos de *T. actinophylla* dos Cerrados Setentrional e Meridional

FLAT: Flavonoides totais; EAG: Equivalente de ácido gálico; ER: Equivalente de rutina; EHTactS: Extrato hexânico de *Terminalia actinophylla* do Cerrado Setentrional; EETactS: Extrato etanólico de *T. actinophylla* do Cerrado Setentrional; EATactS: Extrato aquoso de *T. actinophylla* do Cerrado Setentrional; EHTactM: Extrato hexânico de *T. actinophylla* do Cerrado Meridional; EETactM: Extrato etanólico de *T. actinophylla* do Cerrado Meridional; EATactM: Extrato aquoso de *T. actinophylla* do Cerrado Meridional. Os resultados acima são a média ± desvio padrão (n=3). Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem entre si significativamente pelo teste F (ANOVA) a 5% de probabilidade.

3.4 Atividade anticolinesterásica

O ensaio para detecção de inibição qualitativa da enzima acetilcolinesterase (AchE) foi realizada em Cromatografia em Camada Delgada (CCD) utilizando-se como revelador o reagente de Ellman.

A determinação de um resultado positivo é feita pela observação de manchas brancas, que significam que não ocorreu hidrólise da acetilcolina que é um neurotransmissor que se degrada pela ação da enzima acetilcolinesterase, onde a inibição desta corresponde a um dos métodos encontrados para melhorar o funcionamento do sistema colinérgico (ALMEIDA, 1998).

Os extratos das folhas de *Terminalia actinophylla* Mart. do Cerrado Setentrional não apresentaram resultado positivo para inibição da enzima acetilcolinesterase, em contrapartida os extratos do Cerrado Meridional apresentaram indicativo de resultado positivo, sugerindo que esta espécie possui substâncias anticolinesterásicas tanto de caráter polar como apolar.

3.5 Atividade citotóxica

Dentre os resultados obtidos para a citotoxicidade, pode-se observar na Tabela 4 que houve uma variação da atividade de moderada (entre 50-75%) a muita ativa (entre 75-100%) para os extratos dos espécimes coletados no Cerrado Setentrional frente às linhagens tumorais HCT-116 (côlon humano) e OVCAR-8 (carcinoma de ovário).

Para o espécime do Cerrado Meridional a atividade citotóxica variou de fraca (entre 1-50%) a moderada, sendo que o extrato hexânico não exibiu atividade frente às três linhagens de células, enquanto o extrato etanólico mostrou-se moderado.

Embora nenhum dos outros extratos tenham se apresentados muito ativo contra as três linhagens tumorais, o extrato etanólico (EETactS) promoveu inibição de crescimento celular de 80,37% e 83,66% frente às linhagens HCT-116 (cólón humano) e OVCAR-8 (carcinoma de ovário), respectivamente.

Para a linhagem SF-295 (glioblastoma humano) os extratos etanólicos (EETactS e EETactM) revelaram moderado potencial citotóxico (62,69 e 65,73%) e inferior ao controle positivo, Doxorubicina (83,60%).

Aplicando-se a análise de variância (ANOVA) observou-se diferenças significativas entres os extratos das folhas de *T. actinophylla* nas duas áreas de coleta, sendo as médias submetidas ao teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Extrato/ linhagem	HCT-116	OVCAR-8	SF-295
EHTactS	53,75±6,03 ^d	59,52±13,37 ^{ab}	28,28±1,49 ^c
EETactS	80,37±1,86 ^{ab}	83,66±5,56 ^{ab}	62,69±1,67 ^b
EATactS	79,41±1,41 ^{ab}	78,97±0,00 ^{ab}	59,67±2,60 ^b
EHTactM	-5,88±6,60 ^e	3,35±1,71 ^c	37,13±2,26 ^c
EETactM	59,43±11,41 ^{cd}	71,32±4,29 ^{ab}	65,73±4,75 ^b
EATactM	73,78±5,10 ^{bc}	47,40±45,14 ^{bc}	-11,85±1,75 ^d
Doxorrubicina	96,80±4,60 ^a	100,0±0,70 ^a	83,60±3,00 ^a

Tabela 4 – Porcentagem da atividade citotóxica dos extratos hexânicos, etanólicos e aquosos de *T. actinophylla* do Cerrado Setentrional e Meridional frente a três linhagens celulares

EHTactS: Extrato hexânico de *Terminalia actinophylla* do Cerrado Setentrional; EETactS: Extrato etanólico de *T. actinophylla* do Cerrado Setentrional; EATactS: Extrato aquoso de *T. actinophylla* do Cerrado Setentrional; EHTactM: Extrato hexânico de *T. actinophylla* do Cerrado Meridional; EETactM: Extrato etanólico de *T. actinophylla* do Cerrado Meridional; EATactM: Extrato aquoso de *T. actinophylla* do Cerrado Meridional; HCT-116: colorretal humano; OVCAR-8: ovário humano; SF-295: glioblastoma humano. Os resultados acima são a média ± desvio padrão (n=3). Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem entre si significativamente pelo teste *F* (ANOVA) a 5% de probabilidade.

3.6 Determinação do fator de proteção solar

Apesar dos raios ultravioletas serem benéficos e essenciais para o ser humano, como no processo de ativação da vitamina D, a exposição prolongada ao sol pode trazer malefícios que vão desde queimaduras leves ao desenvolvimento de câncer de pele (RAI; SHANMUGA; SRINIVAS, 2012).

Os raios ultravioletas dividem-se em ultravioleta A (UVA: 320-400 nm); ultravioleta B (UVB: 290-320 nm) e ultravioleta C (UVC: 200-290 nm), sendo a UVA e UVB as de maiores impactos no nosso organismo, o que tem despertado a indústria farmacéutica na busca de protetores solares eficientes para esse tipo de radiação (ORTIZ; YAN; D'ORAZIO, 2014).

Conforme com a legislação brasileira, RDC 237 de 22/08/2002 (BRASIL, 2002) um produto é considerado adequado para utilização em cosméticos como fotoprotetor, ao apresentar um FPS igual ou superior a 2.

Os extratos etanólicos e aquosos foram avaliados para determinar a sua capacidade de absorver os raios UVB e demonstraram serem fotoprotetores com valores de FPS bem acima de 2. Os valores de FPS obtidos na maior concentração (100 $\mu\text{g/mL}$), variaram de 15,14 (EETactS) e 8,06 (EATactS) a 12,93 (EETactM) e 15,03 (EATactM) (Gráfico 3). O maior fator de proteção solar (FPS) foi registrado no EETactS e o menor foi para o EATactS.

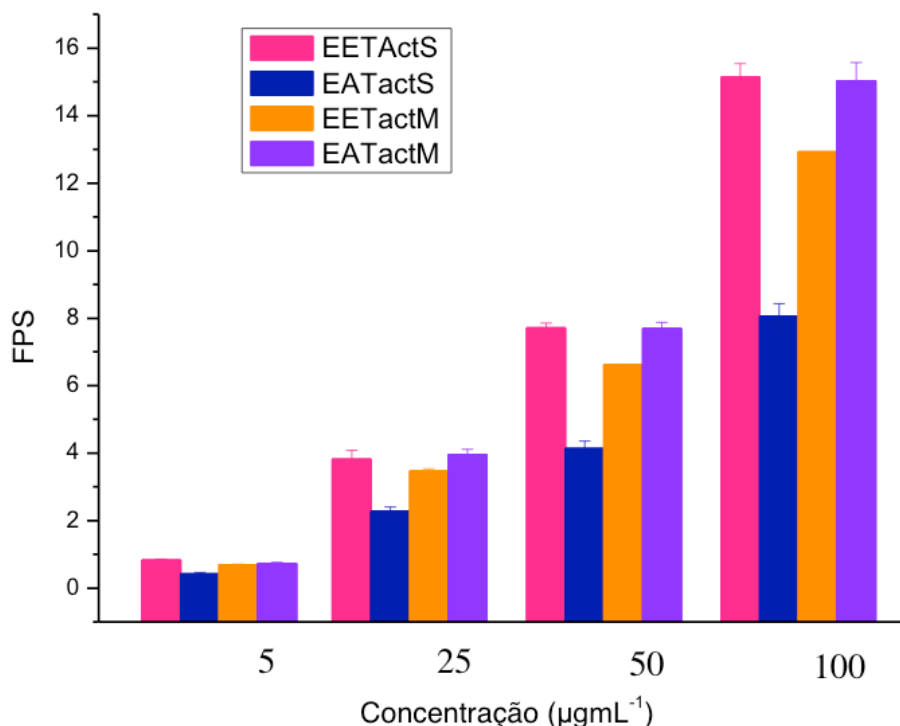


Gráfico 3 - Fator de proteção solar nas concentrações 5, 25, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ do extrato etanólico (1) e aquoso (2) das folhas de *T. actinophylla* Setentrional e Meridional.

3.7 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A avaliação da similaridade entre os perfis cromatográficos obtidos para os extratos dos espécimes nas duas diferentes regiões do cerrado foi realizada por comparação dos tempos de retenção e intensidade dos sinais cromatográficos observados e espectros de absorção, obtidos a 254 nm, conforme apresentado nas Figuras 4 e 5.

A similaridade entre os perfis cromatográficos de *Terminalia actinophylla* do Cerrado Setentrional e Meridional é notável, o que era esperado tratando-se da mesma espécie.

Ao observarmos o cromatograma dos extratos etanólicos (Figura 1), a banda em 20,1 min possui maior intensidade no EETactM, ou seja, está em maior concentração; entretanto a banda em 32,0min possui maior intensidade no EETactS. O conjunto de bandas que se sobrepõe entre $t_r = 22,6$ e 27,0min possui sempre maior intensidade no EETactS.

Os perfis cromatográficos dos extratos aquosos, EATactS e EATactM, são

bastante similares, observando-se variações apenas nas intensidades das bandas. As bandas ($t_r=13,2\text{min}$), ($t_r=29,3\text{min}$) e ($t_r=32,0\text{min}$) possuem maior intensidade para o extrato EATactM, as bandas ($t_r=26,6\text{min}$), ($t_r=28,5\text{min}$) e ($t_r=37,3\text{min}$) possuem maior intensidade no extrato EATactS. As bandas $t_r=26,6\text{min}$ e $t_r=32,0\text{min}$ possuem a menor diferença de intensidade entre as bandas.

Com a análise dos perfis cromatográficos podemos perceber as respostas químicas distintas, em termos de quantidade, devido ao ambiente em que as plantas foram coletadas, isso pode ser corroborado com a diferença também observada no potencial das atividades farmacológicas.

A diversidade observada nos perfis cromatográficos ressalta a diferença nos extratos da espécie em estudo devido ao ambiente em que as folhas foram coletadas, o que foi observado também nas atividades farmacológicas.

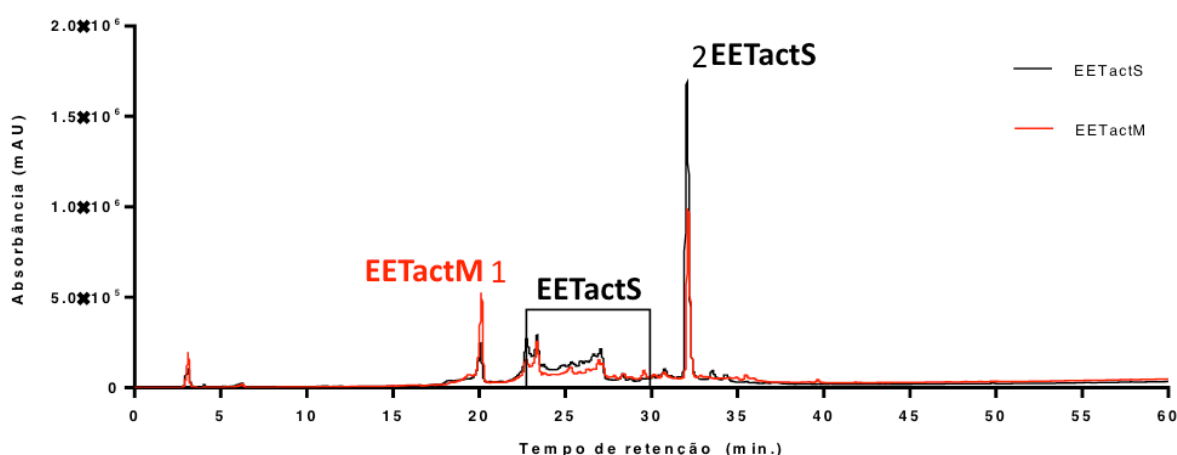


Figura 4 - Perfil Cromatográfico obtido por CLAE do extrato etanólico de *Terminalia actinophylla* do Cerrado Setentrional e Meridional. Coluna C18 (250 x 4,6 mm 5 μm) eluído em gradiente com MeOH/H₂O 5%-100% em 60min, 1 mL/min, 254 nm).

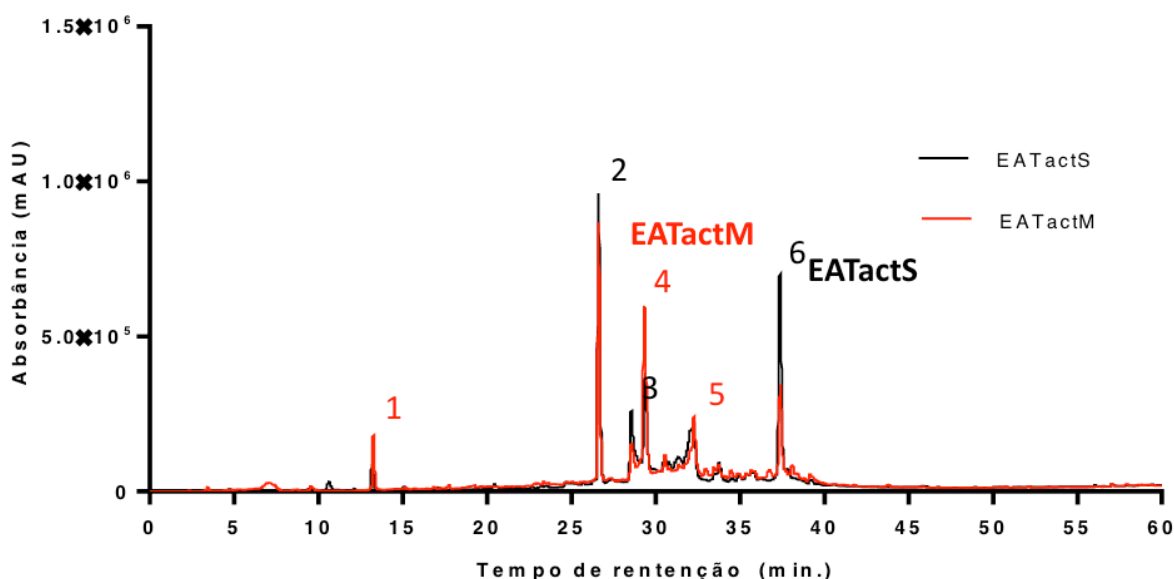


Figura 5 - Perfil Cromatográfico obtido por CLAE do extrato aquoso de *Terminalia actinophylla* de Cerrado Setentrional e Meridional. Coluna C18 (250 x 4,6 mm 5 μm) eluído em gradiente com MeOH/H₂O 5%-100% em 60min, 1 mL/min, 254 nm).

3.8 Análise de Componentes Principais (PCA)

Com a finalidade de reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados, preservando ao mesmo tempo o máximo de informações, aplicou-se a análise de componentes principais (PCA) aos extratos das folhas dos espécimes de *Terminalia actinophylla* em duas regiões do Cerrado (Setentrional e Meridional) foi capaz de explicar 79% da variância total. Os componentes principais 1 e 2 representaram 67% (CP1) e 12% (CP2) do comportamento do conjunto de dados.

Os resultados da PCA gerou um gráfico bi-plot (*scores* e *loadings*). O Gráfico 4 mostra a formação de dois novos conjuntos de dados chamados escores e pesos, os quais trazem informações sobre as amostras (extratos) e as variáveis (atividades farmacológicas), onde os eixos são as componentes principais (PCs).

A interpretação gráfica, nos permite observar que a separação dos extratos hexânicos (EHTactS e EHTactM) ocorre por meio da PC1 em função das atividades antioxidantes e citotóxica. Os ensaios de $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ e hidroxila estão mais correlacionados com o EHTactS, enquanto o óxido nítrico e TBARS estão mais relacionados ao EHTactM. A atividade frente as linhagens OVCAR-8 e HCT-116 está mais relacionada ao EHTactS enquanto que para a linhagem SF-295 está mais correlacionada AP EHTactM.

Os extratos etanólicos (EETactS e EETactM) foram separados através da PC2, pelas variáveis FLAT, FT, FPS e SF-295 (correlacionadas negativamente), sendo as 3 primeiras relacionadas ao EETactS e a última (FPS) ao EETactM.

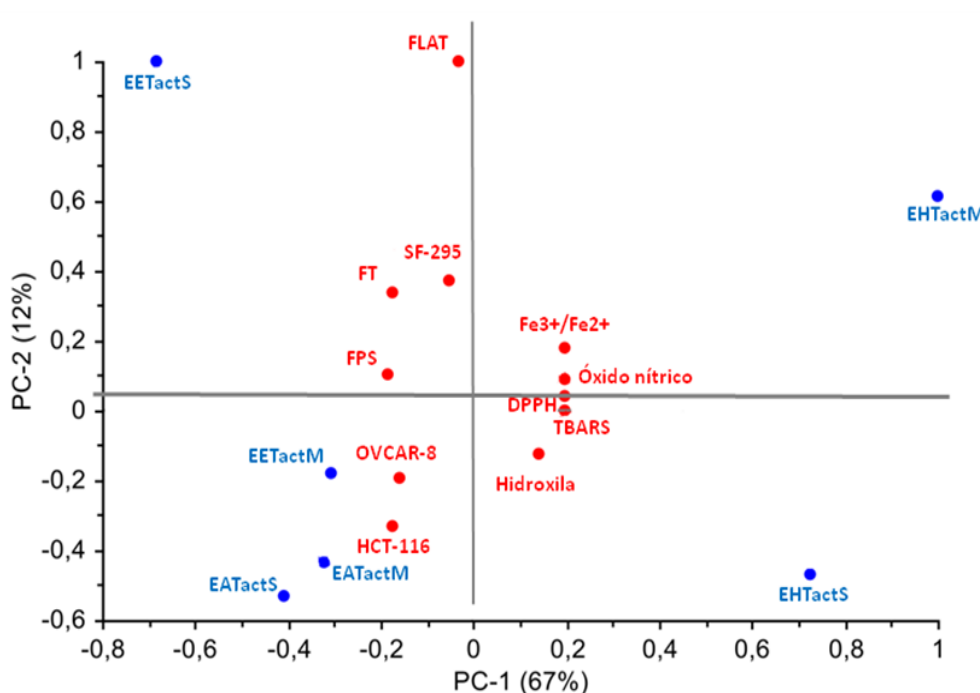


Gráfico 4. Gráfico bi-plot dos escores dos componentes 1 x 2 (CP1/CP2), na análise dos componentes principais para os extratos das folhas de *T. actinophylla* coletadas em 2 áreas e Cerrado: no município de Jatobá do Piauí-PI (S 04°51'48,6" W 42°04'19,6"), alt. 90 m.n.m. e Bom Jesus-PI (S 09°18'44,0" W 44°32'39,7"), alt. 367 m.n.m.

Os extratos aquosos foram separados pela PC1 por meio das atividades citotóxicas OVCAR-8 e HCT-116 (correlacionadas negativamente). Pode-se verificar que o extrato EATactS se destacou frente a essas duas linhagens de células, pois se mostrou fortemente ativo.

4 | CONCLUSÃO

Nas duas regiões de Cerrado (Setentrional e Meridional), os extratos etanólico e aquoso das folhas dos espécimes de *Terminalia actinophylla* Mart. apresentaram uma CE_{50} , menor do que o padrão rotina e conseqüentemente, uma maior atividade antioxidante avaliada no ensaio do DPPH.

Em relação aos compostos fenólicos, os extratos etanólicos (EETactS e EETactM), em ambas regiões, apresentaram altos teores de fenóis totais. Para o Cerrado Setentrional, o EETactS foi o mais rico em teores totais de flavanoides, enquanto que para o Cerrado Meridional o destaque foi para o EHTactM que revelou comportamento atípico, provavelmente explicado pela presença de carotenoides.

Somente os extratos das folhas de *Terminalia actinophylla* Mart. do Cerrado Meridional apresentaram resultado positivo para inibição da enzima acetilcolinesterase, sugerindo que os espécimes coletados nesta região possuem substâncias anticolinesterásicas.

Por meio das atividades citotóxicas, observou-se expressivos percentuais de inibição do crescimento celular maior que 78% frente às linhagens de células OVCAR-8 e HCT-116 para os extratos etanólico e aquoso das folhas dos espécimes de *T. actinophylla* coletadas na região do Cerrado Setentrional.

Os valores do fator de proteção solar (FPS) variaram de 8,06 à 15,14, sendo o maior registro para o EETactS do Cerrado Setentrional. Esse resultado mostra que espécimes de *T. actinophylla* da região Norte do estado do Piauí podem ser utilizadas para este fim.

A espécie, objeto deste estudo, exibiu uma elevada atividade antioxidante. Os perfis no UV-Vis dos extratos hexânicos apresentaram indicativo de compostos carotenoides, enquanto os extratos etanólicos e aquosos mostraram absorções características de flavonoides.

Os resultados obtidos para a espécie *T. actinophylla* sugere que a planta tem um promissor uso e desperta o interesse no isolamento e identificação das substâncias responsáveis pelas diferentes atividades farmacológicas.

A diferença química entre as espécies coletadas no Cerrado Meridional e Setentrional, pode ser observada por meio dos perfis cromatográficos, a diferença é principalmente quantitativa. Essa variedade quantitativa provoca a variação observada nas respostas das atividades farmacológicas. Ao observarmos o PCA

podemos perceber os parâmetros que causam a distinção entre os extratos. Assim, pode-se notar que a diferença no ambiente, seja fatores abióticos e bióticos, em que a planta está inserida, provoca uma mudança química intra-espécie.

REFERÊNCIAS

- ABREU, B. R. R.; PÁDUA, P. F. M. R.; LEHMANN, M.; DIHL, R. R.; ANDRADE, H. H. R. estudo da atividade mutagênica e antimutagênica do extrato etanólico de *Terminalia actinophylla* através do teste SMART em *Drosophila melanogaster*. In: **Anais**. XI Salão de iniciação científica PUCRS. Universidade Luterana do Brasil (ULBRA - Canoas-RS - Brasil), 2010.
- ALMEIDA, O. P. Tratamento da doença de Alzheimer: avaliação crítica sobre o uso de anticolinesterásicos. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 56, p. 688-696, 1998.
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; MARCUS V. BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- BONOLI, M.; VERARDO, V.; MARCONI, E.; CABONI, M. F. Antioxidant phenols in barley (*Hordeum vulgare* L.) flour: comparative spectrophotometric study among extraction methods of free and bound phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. ano 11, v. 52, n. 16, p. 5195-5200, 2004.
- BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010.
- BRASIL. Presidência da República. Resolução RDC nº 237, de 02 de agosto de 2002. **Diário Oficial da União**, Brasília, 26 ago. 2002.
- BURIOL, L.; FINGER, D.; SCHMIDT, E. M.; SANTOS, J. M. T.; ROSA, M. R.; QUINÁIA, S. P.; TORRES, Y. R. Chemical composition and biological activity of oil propolis extract: an alternative to ethanolic extract. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 296-302, 2009.
- CASTRO, A. A. J. **Comparação florístico-geográfica (Brasil) e fitossociologia (Piauí-São Paulo) de amostras de cerrado**. 520p. 1994. Tese (Doutorado). UNICAMP.
- CASTRO, A. A. J. F.; MARTINS, F. R. Cerrados do Brasil e do Nordeste: caracterização, área de ocupação e considerações sobre a sua fitodiversidade. **Pesquisa em Foco**, v. 7, n. 9, p. 147-178, 1999.
- ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES JR., V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, n. 1, p. 88-95, Jul. 1961.
- ESTERBAUER, H. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 57, n. 5, p. 779-785, 1993.
- FERREIRA, E. L. F. MASCARENHAS, T. S.; OLIVEIRA, J. P. C.; CHAVES, M. H.; ARAÚJO, B. Q.; CAVALHEIRO, A. J. Phytochemical investigation and antioxidant activity of extracts of *Lecythispisonis* Camb. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 8, n. 8, p. 353-360, 2014.
- FOLIN, O.; CIOCALTEAU, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 73, p. 627-650, 1927.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos

secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

INGKANINAN, K.; TEMKITTHAWON, P.; CHUENCHOM, K.; YUYAEM, T.; THONGNOI, W. Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, p. 261-264, 2003.

LOPES, G. K.B; SCHULMAN, H. M.; HERMES-LIMA, M. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton Reaction by complexing ferrous ions. **Biochimica et Biophysica Acta** n.1472, p.142-152, 1999.

MANSUR, J. S.; BREDER, M. V. R.; MANSUR, M. C. A.; AZULAY, R. D. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 61, p. 121-124, 1986.

OLIVEIRA JÚNIOR, R.; ARAÚJO, C. S.; SOUZA, G. R.; GUIMARÃES, A. L.; OLIVEIRA, A. P.; LIMA-SARAIVA, S. R. G.; MORAIS, A. C. S.; SANTOS, J. S. R.; ALMEIDA, J. R. G. S. *In vitro* antioxidant and photoprotective activities of dried extracts from *Neoglaziovia variegata* (Bromeliaceae). **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3, p. 122-127, 2013.

ORTIZ, A. A.; YAN, B.; D'ORAZIO, A. J. Ultraviolet radiation, aging and the skin:prevention of damage by topical CAMP manipulation. **Molecules**, v.19, n. 5, p. 6202-6219, 2014.

PÁDUA, P. F. M. R.; DIHL, R. R.; LEHMANN, M.; ABREU, B. R.; RICHTER, M. F.; ANDRADE, H. H. Genotoxic, antigenotoxic and phytochemical assessment of *Terminalia actinophylla* ethanolic extract. **Food and Chemical Toxicology**, v. 62, p. 521-527, 2013.

RAI, R., SHANMUGA, S. C.; SRINIVAS, C. Update on photoprotection. **Indian journal of dermatology**. v. 57, n. 5, p. 335-42, 2012.

RHEE, I. K.; MEENT, M. V.; INGKANINAN, K.; VERPOORTE, R. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. **Journal of Chromatography**, v. 915, p. 217-223, 2001.

RIVAS, M. P. (coord.). **Macrozoneamento Geoambiental da Bacia Hidrográfica do Parnaíba**. Rio de Janeiro, IBGE. (Série Estudos e Pesquisas em Geociências, 4). 1996.

SANTANA, L. C. L. R.; SILVA, O. A.; BRITO, M. R. M.; DAVID, J. P. L.; DAVID, J. M.; GALVÃO, K. C. S.; MORAES, J.; FREITAS, R. M. Avaliação do potencial antioxidante, atividade antimicrobiana e antihelmíntica do extrato etanólico padronizado das folhas de *Mikania glomerata* Sprengel. **Revista Brasileira de Farmácia**. v. 94 (2), p. 120-129, 2013.

SINGHAL, M.; PAUL, A.; SINGH, H. P. Synthesis and reducing power assay of methyl semicarbazone derivatives. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 18, p. 121-127, 2014.

SOUSA, C. M. M; ROCHA, S., H.; VIEIRA-JR., G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, p. 351-355, 2007.

SOBRE A ORGANIZADORA

Ruth Raquel Soares de Farias - Possui graduação em Licenciatura Plena em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Piauí (1999), bem como a Especialização em Ciências Ambientais (2001), mestrado em Biologia Vegetal pela Universidade Federal de Pernambuco (2003) e doutorado pelo programa de Biotecnologia (RENORBIO - UFPI) 2016. Professora da Faculdade de Ensino Superior do Piauí (FAESPI), no curso de Fonoaudiologia, Fisioterapia, Educação Física, Pedagogia e Psicologia.; Professora da AESPI do curso de Estética e Cosmética e Fisioterapia; Professora titular do Governo do Estado do Piauí trabalhando com Educação nas Prisões; Professora Substituta da Universidade Federal do Piauí (DMTE/ 2017-2019) e Pesquisadora do Programa de Biodiversidade do Trópico Ecotonal do Nordeste (BIOTEN) e presta serviços de caráter técnico para a Associação deste programa (ABIOTEN). Tem experiência na área de Botânica, Ecologia e Macrofauna Bêntica, com ênfase em inventário e monitoramento das fitocomunidades do Cerrado e Ecótonos associados, principalmente nas seguintes frentes: biodiversidade, sustentabilidade, ambientalismo e educação ambiental

ÍNDICE REMISSIVO

A

Anticholinesterase activity 2, 20, 39

Antioxidant activity 2, 15, 20, 34, 39, 57

Antioxidante 1, 2, 3, 4, 8, 9, 10, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 22, 24, 25, 26, 27, 33, 34, 35, 36, 38, 39, 42, 46, 47, 48, 49, 50, 56, 57, 58

Atividade anticolinesterásica 1, 2, 3, 6, 10, 11, 19, 23, 28, 39, 51

Atividade antioxidante 1, 2, 4, 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 22, 24, 25, 26, 27, 33, 34, 36, 38, 42, 46, 47, 48, 49, 50, 56, 57, 58

Atividade citotóxica 1, 2, 6, 11, 13, 23, 29, 38, 44, 51, 52

B

Biodiversidade 15, 20, 35, 39, 40, 59

Biodiversity 20, 39

C

Cerrados do nordeste 20, 39

Cerrados of Northeast 20, 39

Chemistry variability 20

Cytotoxic activity 2, 39

F

Fitogeografia 2

Fitoquímica 2, 14, 32, 57

Fotoproteção 39

P

Phytochemistry 2, 35

Phytogeography 2

V

Variabilidade química 20

 **Atena**
Editora

2 0 2 0