

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

***Trichilia silvatica* (C. DC.): Perfil fitoquímico, avaliação antioxidante e anti-inflamatória**

JACENIR VIEIRA DA SILVA

Dourados - MS  
2018

JACENIR VIEIRA DA SILVA

***Trichilia silvatica* (C. DC.): Perfil fitoquímico, avaliação antioxidante e anti-inflamatória**

Dissertação apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados – Faculdade de Ciências da Saúde, para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Farmacologia/  
Toxicologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Anelise Samara Nazari Formagio.

Dourados - MS  
2018

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).**

S586t Silva, Jacenir Vieira da  
*Trichilia silvatica* (C. DC.): perfil fitoquímico, avaliação antioxidante e anti-inflamatória / Jacenir Vieira da Silva. –2018.  
69 f.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Anelise Samara Nazari Formagio.  
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) –Universidade Federal da Grande Dourados, 2018.

1. *Trichila silvatica*, - Catiguá (Meliceae) 2. Plantas medicinais - Estresse oxidativo. 3. Plantas medicinais - Constituintes químicos. I. Título.

**Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).**

**©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.**



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA PELO CANDIDATO JACENIR VIEIRA DA SILVA, ALUNO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CIÊNCIAS DA SAÚDE ÁREA DE CONCENTRAÇÃO "FARMACOLOGIA", REALIZADA NO DIA 15 DE SETEMBRO DE 2016.

Ao décimo quinto dia do mês de setembro do ano de dois mil e dezesseis (15/09/2016), às 14h, em sessão pública, realizou-se, no Auditório da Faculdade de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Grande Dourados, a Defesa de Dissertação de Mestrado intitulada "Trichilia siliuatica (C. DC.): Perfil fitoquímico, avaliação antioxidante e anti-inflamatória" apresentada pelo mestrando JACENIR VIEIRA DA SILVA, do Programa de Pós-Graduação Mestrado em Ciências da Saúde, à Banca Examinadora constituída pelos professores Dra. Anelise Samara Nazari Formagio (Presidente/orientadora), Dra. Eliana Janet Sanjinez Argonzoña (membro titular/externo), Dra. Ana Paula Boleti (membro titular/externo) e Dra. Claudia Andrea Lima Cardoso (membro titular/externo). Iniciada sessão, a presidência deu a conhecer ao candidato e aos integrantes da Banca as normas a serem observadas na apresentação da Dissertação. Após o candidato ter apresentado a sua Dissertação, os componentes da Banca Examinadora fizeram suas arguições, que foram intercaladas pela defesa do candidato. Terminadas as arguições, a Banca Examinadora, em sessão secreta, passou ao julgamento, tendo sido o candidato considerado APROVADO, fazendo jus ao título de MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Dourados, 15 de setembro de 2016.

Dra. Anelise Samara Nazari Formagio

Dra. Eliana Janet Sanjinez Argonzoña

Dra. Ana Paula Boleti

Dra. Claudia Andrea Lima Cardoso

ATA HOMOLOGADA EM: / / , PELA PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA / UFGD.

DOCUMENTO CONFERE  
COM ORIGINAL

Em 02/10/2017

Patricia Leticia Taini

Profa. Kelly de Fozil Souza  
Pró-Reitora de Ensino de Pós-Graduação e Pesquisa

## **DEDICATÓRIA(S)**

Dedico este trabalho a minha mãe Domingas Rosa da Silva que me concebeu a vida e deu-me suporte, apoio e incentivo em meus estudos; a minha esposa Anahy Arruda Burigato pelo apoio, incentivo e parceria e meu filho Marco Túlio Burigato Vieira, por sua alegria e disposição; in memoriam de minha avó Maria das Dores Rosa e meu avô Ananias Rosa que sempre em suas vidas estiveram ao meu lado em todas as situações incondicionalmente.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente ao Altíssimo criador do Universo pelo dom da vida e permissão para que pudesse realizar este sonho de realizar um mestrado; aos meus familiares em especial minha mãe Domingas Rosa da Silva por sempre me incentivar e apoiar na senda do bem e novo crivo da razão a dedicar-me aos estudos, sempre enfatizando a importância do aprimoramento moral e intelectual em nossa passagem terrena; a minha esposa Anahy Arruda Burigato pelo apoio e paciência durante esta jornada; aos mestres desde a primeira professora, que carinhosamente permitia lhe chamar de “tia Marilda”; a minha orientadora Dra Anelise Samara Nazari Formagio, pelo apoio, compreensão, ensinamento e auxílio durante este mestrado que sem isso jamais conseguiria chegar a este nível de pesquisa, sempre sendo um exemplo de pesquisadora para mim pela dedicação, amor e paixão na docência e pesquisa; a Dra Cândida Aparecida Leite Kassuya pela parceria, apoio e exemplo de pessoa, docente e pesquisadora;

Aos colegas da FCS- Faculdade de Ciências da Saúde que sempre se dispuseram a ajudar-me com tudo que estava ao seu alcance, expondo sua experiência em pesquisa e docência a se citar Prof. Fabio Juliano Negrão, Msc. Débora Hoff Brait (Biomédica), Msc. Cleide Signor Tirlone.

A equipe de pesquisa da Dra Anelise pelo apoio e parceria incansável e incondicional Carla Voluboff, Diego Cegóbia, Marciane, Matheus, Yara Marchioro.

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original”.

Albert Einstein

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Descrição das inter-relações entre as atividades do projeto.....	15
Figura 2: Limonoides isolados de <i>T. americana</i> .....	17
Figura 3: Limonoides isolados de <i>T. connoroides</i> .....	18
Figura 4: Limonoides e seco-protolimonoides isolados de <i>T. elegans</i> .....	19
Tabela 1: Atividades biológicas e constituintes relatados em espécie de <i>Trichilia</i> .....	20
Figura 5. <i>Trichilia silvatica</i> presente em Dourados, Mato Grosso do Sul. A- Tronco da espécie <i>Trichilia silvatica</i> e B- Folhas da espécie <i>Trichilia silvatica</i> (VIEIRA-SILVA, 2015) .....	21
Figura 6. Compostos isolados de extratos alcoólicos obtido das folhas de <i>T. silvatica</i> .....	23
Figura 7-Alguns exemplos de ácido fenólicos.....	30
Figura 8-Estrutura da aglicona de sub-classes de flavonoides.....	31
Figura 9. Rota Biossintética dos taninos Hidrolisáveis e condensados a partir do ácido chiquimico.....	32
Figura 10. Estrutura química de alguns Taninos Hidrolisáveis. (59) estrutura química dos galotaninos; (60) estrutura química do ácido gálico; (61) estrutura química do ácido elágico; (62) estrutura química do elagitaninos; (63) ácido tânico.....	33
Figura 11. Estrutura química de alguns taninos condensados: (64) catequina; (65) epicatequina e (66) leucoantocianidina.....	34



## **LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**

DPPH- 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

CAT- catalase

COX- ciclo-oxigenase

DNA-glicosilases- ácido desoxirribonucleico glicosilases.

ERO- Espécies reativas ao oxigênio.

ERN- Espécie reativa ao nitrogênio.

SOD- superóxido dismutases.

CAT- catalase.

GPX- glutathiona peroxidase

Catalase (CAT);

Glutathiona peroxidase (GPX);

NADH (dinucleótido de nicotinamida e adenina) NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato)

SUS- SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE

IUCN- International Union for Conservation of Nature

## ***Trichilia silvatica* (C. DC.): Perfil fitoquímico, avaliação antioxidante e anti-inflamatória.**

### **RESUMO**

*Trichilia silvatica* (C. DC.), Meliaceae, endêmica no Brasil e encontra-se na categoria vulnerável de extinção na lista vermelha de plantas (Red List of Threatened Plants) da IUCN (International Union for Conservation of Nature) no ano de 2004, estando presente em Dourados estado de Mato Grosso do Sul, Brasil é conhecida popularmente como café-do-mato ou catiguá-branco, possui sinônimo *Trichilia cuspidata* (C. DC.). Estudos prévios detectaram a presença de lignanas glicosiladas, esteroides, diterpenos e sesquiterpenos nas folhas e limonóides um de seus principais componentes, bem como ação anti-inflamatória e antioxidante dos óleos essenciais obtidos a partir das folhas de *Trichilia silvatica*. O presente trabalho avalia o perfil fitoquímico do extrato bruto metanólico obtido através das cascas e folhas de *Trichilia silvatica* pelo quantitativo de fenóis totais, flavonoides, flavonol e taninos condensados pelo método fotocolorimétrico utilizando o reagente Folin-Ciocalteu bem como Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). Para avaliação da capacidade antioxidante utilizou-se os ensaios 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), captura do radical livre ABTS+ e sistema beta caroteno/ ácido linoléico. A capacidade anti-inflamatória foi avaliada pelos ensaios: edema de pata, pleurisia induzida por carregenina e artrite induzida por symozan. A atividade anti-proliferativa em células tumorais foi avaliada pelo método de sulforrodamina B. Verificou-se a presença majoritária de fenóis e flavonóides nas cascas e folhas de *T. silvatica* e presença de ácido caféico nas folhas e cascas e ácido sináptico nas cascas. Demonstrou atividade significativa aos ensaios propostos em comparação ao BHT, ácido ascórbico e quercetina, apresentou ação anti-inflamatória significativa por inibir a migração de leucócitos, artrite induzida por symozan e edema de pata. Atividade antiproliferativa demonstrou que o extrato obtido das folhas foi ativo contra células VERO (célula epitelial de rim de macaco verde) e PC-3 (próstata). Além disso, estudos mais detalhados sobre a composição química destes extratos, bem como estudos com outros modelos e ensaios *in vivo* são essenciais para caracterizar e elucidar suas ações biológicas.

Palavras-chave: *Trichilia silvatica*, Catiguá (Meliaceae) estresse oxidativo, constituintes químicos.

## ***Trichilia silvatica* (C. DC.): Phytochemical profile, antioxidant and anti-inflammatory evaluation.**

### **ABSTRACT**

*Trichilia silvatica* (C. DC.), Meliaceae, endemic in Brazil and is in the vulnerable category of extinction in the red list of plants of IUCN (International Union for Conservation of Nature) in the year 2004, being present in Dourados state of Mato Grosso do Sul, Brazil is popularly known as café-do-mato or catiguá-branco, has a synonym *Trichilia cuspidata* (C. DC.). Previous studies have detected the presence of glycosylated lignans, steroids, diterpenes and sesquiterpenes in leaves and limonoids, one of its main components, as well as anti-inflammatory and antioxidant action of the essential oils obtained from the leaves of *Trichilia silvatica*. The present work evaluates the phytochemical profile of the crude methanolic extract obtained from the barks and leaves of *Trichilia silvatica* by the quantitative of total phenols, flavonoids, flavonol and tannins condensed by the photolorimetric method using the Folin-Ciocalteu reagent as well as High Efficiency Liquid Chromatography (HPLC). To evaluate the antioxidant capacity, the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), free radical capture ABTS + and beta carotene / linoleic acid systems were used. Anti-inflammatory capacity was assessed by the tests: paw edema, carrageenan-induced pleurisy and symozan-induced arthritis. The anti-proliferative activity in tumor cells was evaluated by the sulforrodamine B method. The presence of phenols and flavonoids in the husks and leaves of *T. silvatica* and presence of caffeic acid in leaves and bark and synapic acid in the bark were verified. It demonstrated significant activity against the proposed assays compared to BHT, ascorbic acid and quercetin, showed a significant anti-inflammatory action by inhibiting leukocyte migration, symozan-induced arthritis and paw edema. Antiproliferative activity demonstrated that the extract obtained from the leaves was active against VERO cells (green monkey kidney epithelial cell) and PC-3 (prostate) cells. In addition, more detailed studies on the chemical composition of these extracts, as well as studies with other models and in vivo assays are essential to characterize and elucidate their biological actions.

Key words: *Trichilia silvatica*, Catiguá Meliaceae, oxidative stress, chemical constituents.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>16</b>
<b>2.1 Gênero Trichilia</b> .....	<b>16</b>
<b>2.2 Trichilia Silvatica</b> .....	<b>21</b>
<b>2.3 Estresse oxidativo: radicais livres e antioxidante</b> .....	<b>24</b>
2.3.1 Geração de radicais livres .....	25
2.3.2 Antioxidantes .....	26
<b>2.4 Inflamação</b> .....	<b>26</b>
2.4.1 Agentes anti-inflamatórios .....	28
<b>3 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE ORIGEM VEGETAL: EFEITO ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIO</b> .....	<b>29</b>
<b>3.1 Compostos fenólicos</b> .....	<b>29</b>
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	<b>35</b>
<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>35</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>35</b>
<b>5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>36</b>
<b>6 APÊNDICES</b> .....	<b>43</b>
<b>6.1 Anti-inflammatory and antiproliferative activities of the extracts from Trichilia silvatica (C.DC)</b> .....	<b>46</b>
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	<b>68</b>
<b>8 ANEXO</b> .....	<b>69</b>
<b>ANEXO 1- CARTA DE APROVAÇÃO DO CEUA- COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</b> .....	<b>69</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas ao oxigênio (ERO's) ou nitrogênio (ERN) e a capacidade de neutralização pelos sistemas basais através de seus antioxidantes. Esta condição conduz a alterações fisiológicas na homeostase podendo causar danos ao DNA, aos lípidios e as proteínas. Este quadro predispõe ao aparecimento de doenças crônico-degenerativas, tais como Mal de Alzheimer, Doença de Parkinson, Arteriosclerose, Diabetes, processos inflamatórios e neoplasias. Daí a importância da busca de novos antioxidantes naturais não-tóxicos (BARBOSA et.al. 2010; CASTELO-BRANCO et al. 2011; GULCIN et.al. 2003; LUSHCHAK, 2014).

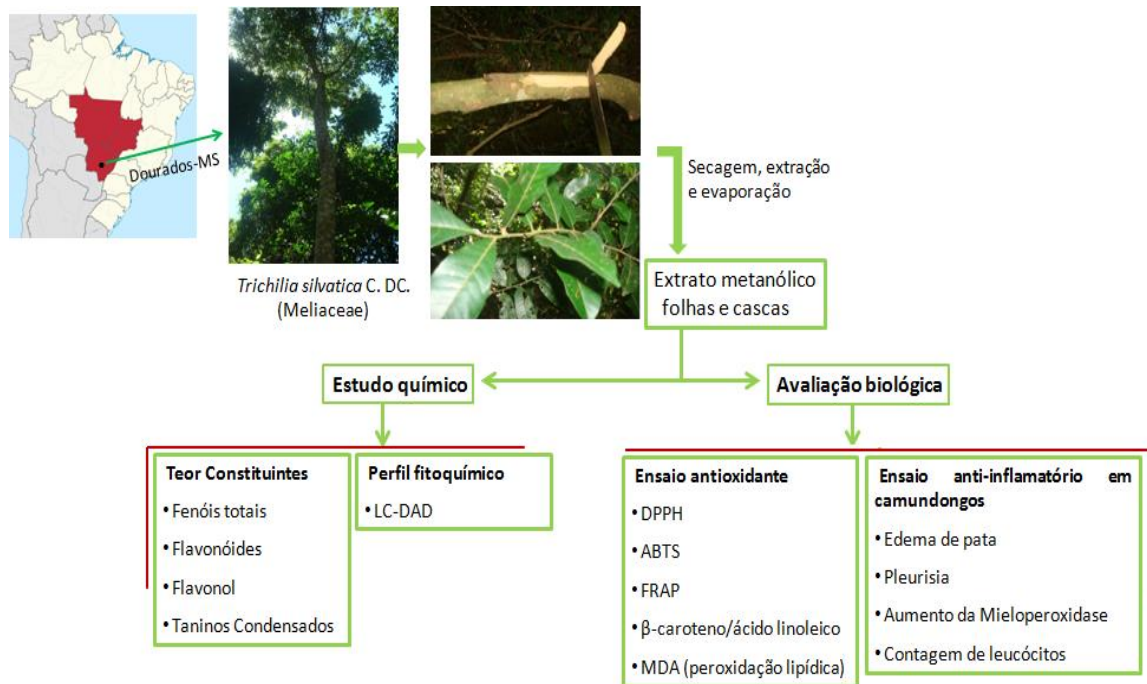
Em dezembro de 2008 pela Portaria nº 2.960, o Ministério da Saúde elaborou uma relação de 71 espécies de Plantas Medicinais com potencial terapêutico de interesse ao Sistema Único de Saúde (SUS), visando orientar a cadeia produtiva e o desenvolvimento de pesquisas que possam subsidiar a elaboração da relação de fitoterápicos disponíveis para uso da população, com segurança e eficácia para o tratamento de determinada doença. Dentre as espécies encontra-se *Maytenus ilicifolia* popularmente conhecida como “espinheira santa”, usada para tratamento de gastrites, úlceras gástricas-duodenal e dispepsias, *Mikania glomerata*, “guaco”, utilizado como antitussígeno, expectorante e broncodilatador, *Schinus terebinthifolius* (pimenta rosa), usada popularmente e comprovada cientificamente, contra inflamação vaginal, *Uncaria tomentosa*, conhecida como “unha-de-gato” utilizado como anti-inflamatórios (FIGUEREDO et.al., 2014; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

Assim, as plantas medicinais formam à base para a descoberta de grande parte dos medicamentos, tais como a aspirina, digitoxina, morfina, quinina e pilocarpina. No entanto, foi à descoberta da "penicilina" que revolucionou a descoberta de novos medicamentos tais como antibióticos: estreptomicina, eritromicina, tetraciclina; antiparasitários: avermectinas; antimaláricos: quinina, artemisinina; agentes de controle lipídico: lovastatina e seus análogos; imunossupressores para transplantes de órgãos: ciclosporina, rapamicinas e drogas antineoplásicas como o taxol, vincristina e vimblastina (BUTLER, 2004; LI e VEDERAS, 2009).

Menos de 10% das cerca de 250.000 espécies de plantas descobertas no mundo foram investigadas de forma contundente, onde o Brasil possui uma rica biodiversidade sendo detentor de cerca de 100 mil espécies vegetais onde menos de 1% foi estudada sobre o aspecto medicinal (WIESE, 2008).

Apesar do uso popular sem nenhum respaldo científico, cerca de 80% da população dos países subdesenvolvidos e desenvolvidos continua dependente da medicina popular (BRAZ FILHO, 2010). Por isso, é importante realizar estudos multidisciplinares envolvendo a etnobotânica, química e a farmacologia para viabilizar um conhecimento mais amplo do uso terapêutico de plantas medicinais de maneira sustentável (MACIEL et al., 2002; COSTA-LOTUFO et al., 2010).

Em virtude dos aspectos previamente discutidos, o nosso grupo de pesquisa vem desenvolvendo o estudo do potencial químico e biológico de plantas presentes na região de Dourados-MS, Estado que apresenta grande diversidade de vegetação, como Cerrados, matas semidecíduas, matas de galeria, dentre outras. Os Cerrados cobrem 65% e as florestas semidecíduas 8,9% da área do Estado do Mato Grosso do Sul (SANGALLI, 2000). Desta forma dando continuidade ao nosso trabalho sobre as plantas de matas de Dourados – MS, com especial interesse em plantas potencialmente bioativas, nos propusemos a avaliação do potencial biológico e determinar o teor de constituintes de *Trichilia silvatica* (Meliaceae). O projeto foi elaborado, especialmente para uma linha dedicada à pesquisa de bioprospecção, que visa à busca de bioprodutos, com destaque para substâncias biologicamente ativas de importância para a indústria farmacêutica. Dentro dessa abordagem, podemos visualizar etapas-chave, como a coleta da espécie, preparo de extratos e avaliação de bioatividade, que caracterizam a pesquisa multidisciplinar (Figura 1). Há poucas pesquisas visando a ação biológica da espécie selecionada para o estudo.



**Figura 1:** Descrição das inter-relações entre as atividades do projeto.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Gênero *Trichilia*.

O gênero *Trichilia* (Meliaceae) possui cerca de 70 espécies, distribuídas principalmente na América tropical e África. No Brasil é representado por mais de 15 espécies, amplamente distribuídas por diferentes regiões do país. Na medicina popular algumas espécies de *Trichilia* são utilizadas para o tratamento de reumatismo e febre, bem como agentes purgativos e eméticos, como exemplo *T. sinensis* e *T. connaroides* que são utilizadas frequentemente para tratar artrite, faringite, amigdalite, osteomielite crônica (GARIMA, 2011; XU et al., 2013).

O gênero é caracterizado principalmente pela presença de limonoides e protolimonoides, com uma gama de atividades biológica relatadas. Dentre elas destaque o estudo de *T. americana* que relata o isolamento de dez limonoides do tipo cedroleno, americanolidas A-D (1-4), 1,2-dihidrodeacetilhirtina (5), 1-hidroxi-1,2-dihidrodeacetilhirtina (6), 1-hidroxi-1,2-dihidrohirtina (7), 1-metoxi-1,2—dihidrodeacetilhirtina (8), 11 $\beta$ -hidroxi-12-propanoiloxicedroleno (9), 1, 11 $\beta$ -dihidroxi-1,2-dihidrocedroleno (10), deacetilhirtina (11) e hirtina (12) (Figura 2). Todos os compostos exibiram potentes e/ou seletiva atividade citotóxica com valores de IC<sub>50</sub> entre 1.0 para 39.6  $\mu$ M (JI et al., 2015).



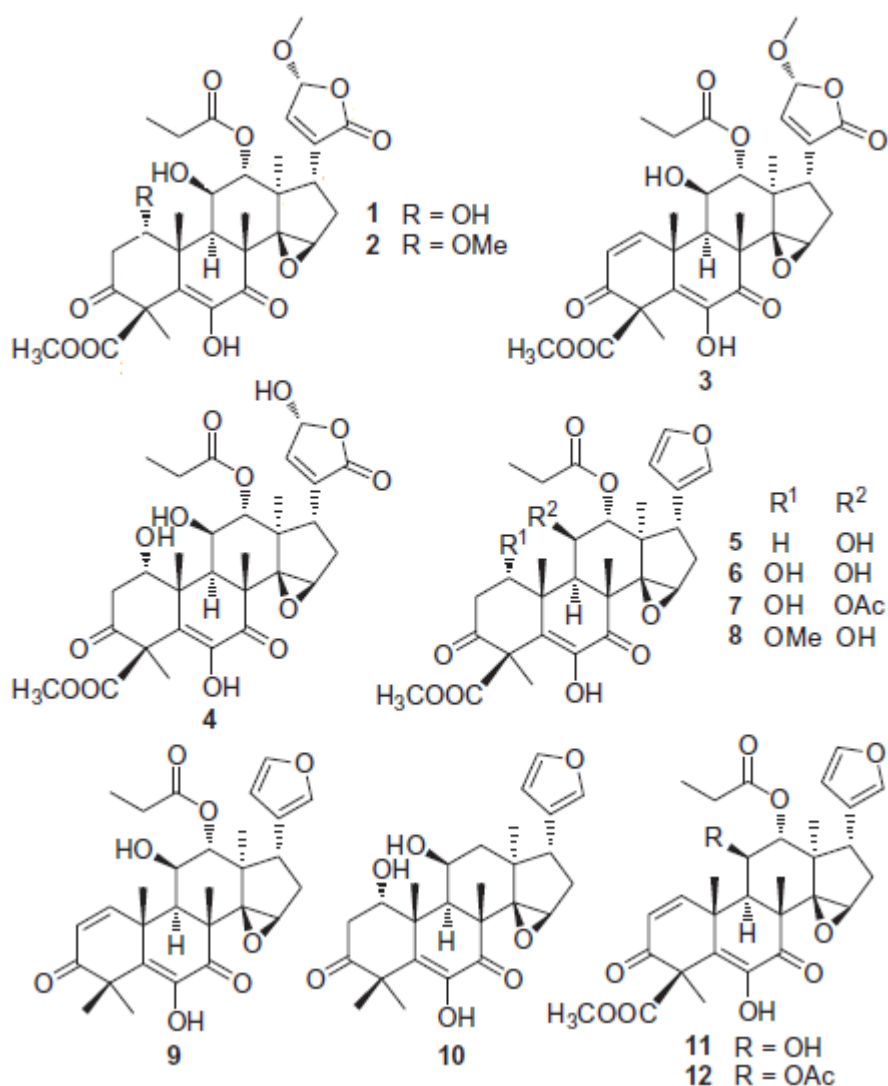


Figura 2: Limonoides isolados de *T. americana*.

Quatro novos limonoides, trichilina A (13), trichilina B (14), trichilitona I (15), 12-deacetoxilrijugina A (16), um pentatriterpeno (17) e outros três limonoides já conhecidos (18 – 19), foram isolados do extrato obtido das cascas de *T. connoroides*. Os novos compostos 15 e 16 exibiram efeitos inibitórios na produção de óxido nítrico em linhagens de macrófagos estimulada por LPS (lipopolissacarídeo) (GENG et al., 2009, JI et al., 2015).

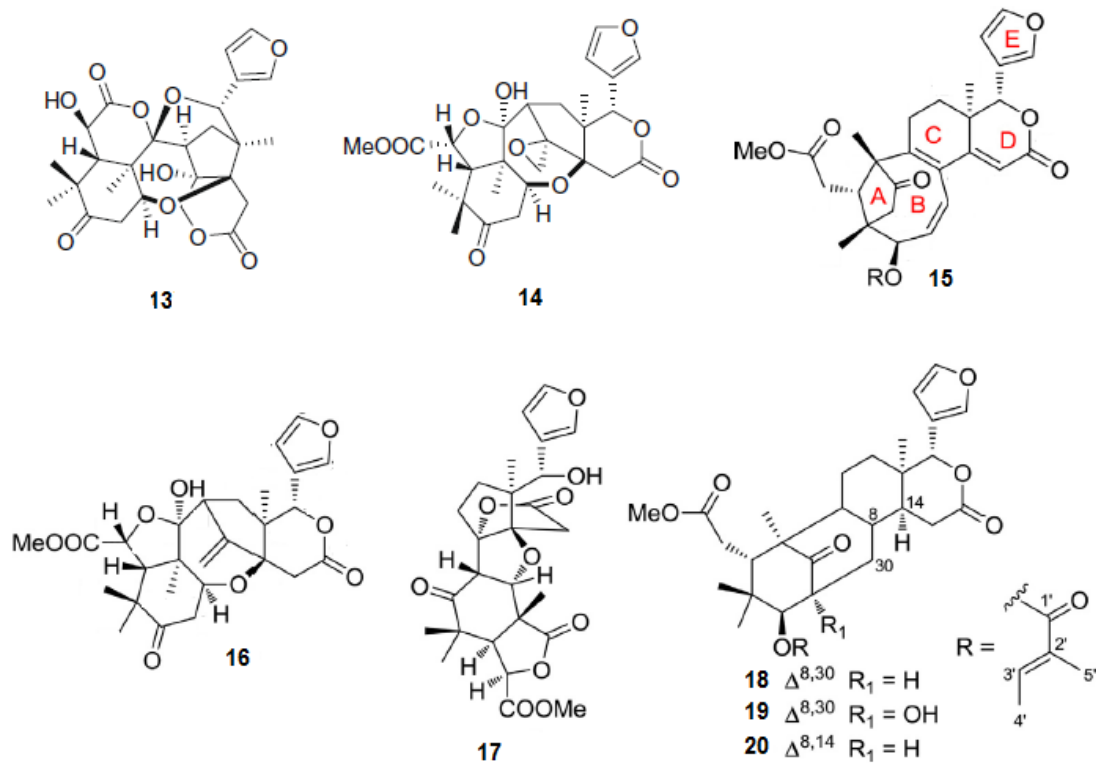


Figura 3: Limonoides isolados de *T. connoroides*.

Do extrato etanólico obtido das sementes e cascas de *Trichilia elegans ssp. elegans* coletadas em Mato Grosso do Sul, foram isolados *seco*-protolimonoides (21-26) (GARCEZ et al., 1997). Na reinvestigação do extrato das sementes foram isolados novos limonoides e limonoides  $\gamma\beta$ -oxigenado (27-37) (GARCEZ et al., 1997, GARCEZ et al., 2000) (Figura 4). O extrato aquoso das folhas de *T. elegans* apresentou efeito imunomodulatório (NORES et al., 1997).

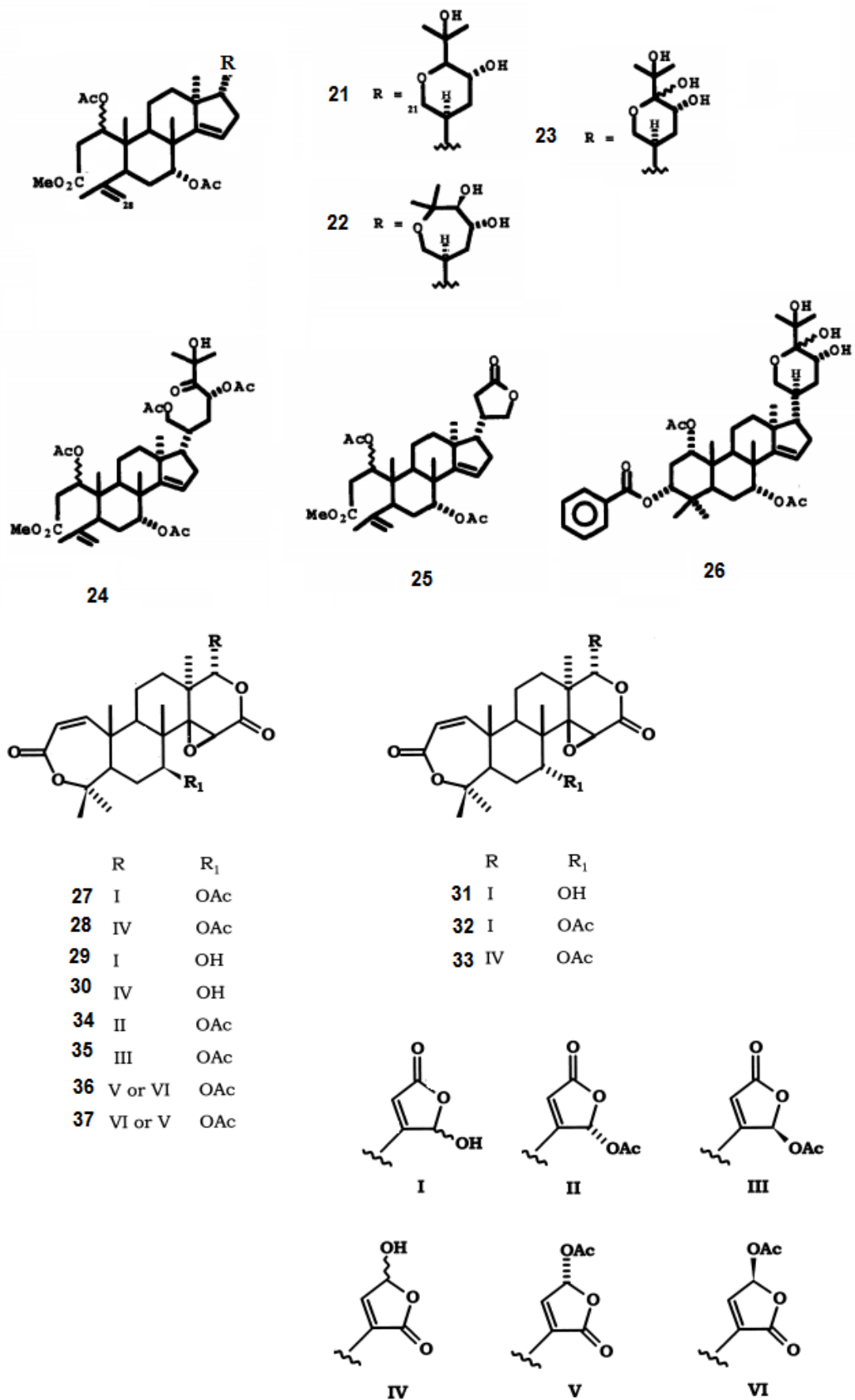


Figura 4: Limonoides e seco-protonolimonoides isolados de *T. elegans*.

Além destes, vários outros derivados limonóides foram isolados de *T. Pallida* (SIMMONDS, et al.; 2001), *T. estipulada* (CORTEZ, 2000), *T. catiguá* (MATOS et.al., 2007). *T. hirta* (CORTEZ et al.; 1992), *T. prieuriana* (OLUGBADE, 1991), *T. havanensis* (ARENAS & RODRIGUEZ-HAHN, 1990), *T. roka* (NAKATANI, 1985), *T. dregeana* (MULHOLLAND & TAYLOR, 1980), *T. rubra* (MUSZA ET AL., 1995) e de *T. clausenii* (PUPO, 1996; 1998).

Os limonóides são, provavelmente, os maiores representantes da classe dos terpenos com atividade inseticida (XIE et al., 1994; ROEL & VENDRAMIM, 1999; BOGORNÍ & VENDRAMIM 2003, 2005) e conhecidos como meliacinas, devido ao seu sabor amargo e suas principais fontes são as espécies da família Meliaceae, Rutaceae e Cneoraceae.

Além da pronunciada atividade inseticida e limonóides relatada por espécies do gênero *Trichilia*, alguns extratos também apresentaram uma variedade de propriedades biológicas e principalmente derivados fenólicos, conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1: Atividades biológicas e constituintes relatados em espécie de *Trichilia*.

Espécie	Parte utilizada	Constituintes químicos	Atividade biológica	Referência
<i>Trichilia heudelottii</i>	Cascas	Saponinas, taninos, compostos fenólicos, alcalóides, antraquinonas	Antiamarflca	Bankole et.al, (2016)
<i>Trichilia emetica.</i>	Folhas	Flavonóides, compostos fenólicos	Antidiarréica e Antimicrobiana	Konaté, (2015)
	Raiz	Polifenóis, limonóides	Hepatoprotetor e antibactericida	Germanò et.al. (2005)
			Antidepressivo	Bonassoli et.al. (2012)
<i>Trichilia catigua</i>	Cascas	_____	Ansiolítico	Chassot et al. (2011)
<i>Trichilia clausenii</i>	Folhas	_____	Anti-helmintico	Cala et.al. (2012)
<i>Trichilia glabra</i>	Folhas	_____	Anti-inflamatória	Benecia et.al. (2000)
	Folhas	Diterpenos e ácidos fenólicos	Antimicrobiano	Aladesanmi e Odediran (2000)
<i>Trichilia heudelotti</i>				
<i>Trichilia roka</i>	Raiz	_____	Antipirético	Sanogo et. al. (2001)
<i>Trichilia dregeana</i>	Folhas	_____	Anti-inflamatório inibidor da COX	Eldeen et.al. (2007)

## 2.2 *Trichilia Silvatica*

*Trichilia silvatica* C. DC., Meliaceae, popularmente conhecida como “catiguá”, “catiguá-branco” ou “cutia-vermelha” no estado de Santa Catarina e “rosa-branca” na Bahia (PENNINGTON, 1981), é uma árvore de porte médio 5 a 10 metros (Figura 1), endêmica no Brasil e encontra-se na categoria vulnerável de extinção (Red List of Threatened Plants) da IUCN (International Union for Conservation of Nature) No Brasil, distribui-se pelos Estados da Bahia, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Espírito Santo (PATRÍCIO e CERVI, 2005).



(A)



(B)

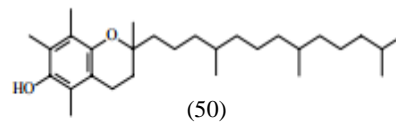
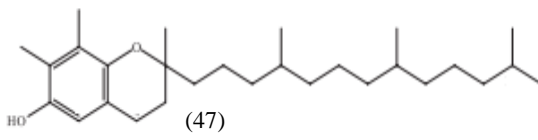
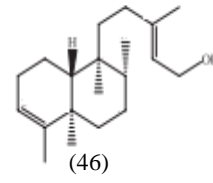
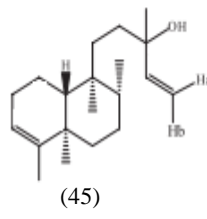
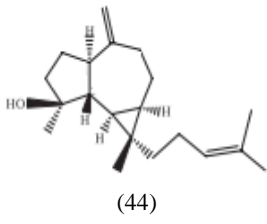
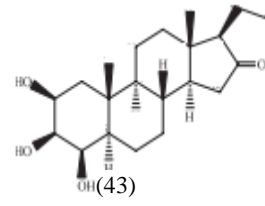
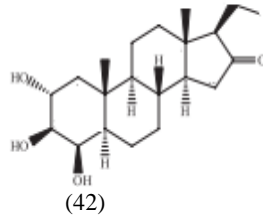
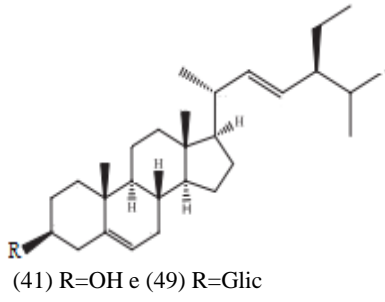
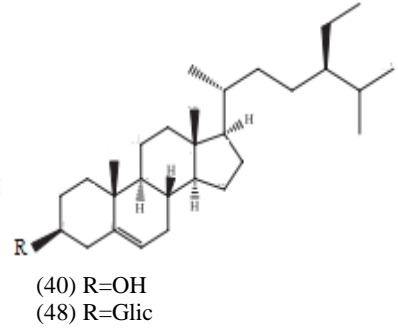
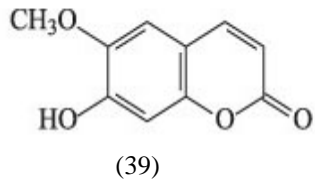
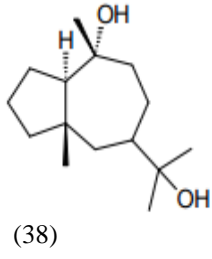
Figura 5. *Trichilia silvatica* presente em Dourados, Mato Grosso do Sul. A- Tronco da espécie *Trichilia silvatica* e B- Folhas da espécie *Trichilia silvatica* (VIEIRA-SILVA, 2015).

Devido a sua diversidade em propriedades fitoquímicas e ações farmacológicas a espécie atualmente vem sendo alvo de várias pesquisas. O estudo químico realizado com o extrato butanólico obtido das folhas de *T. silvatica* coletado no estado do Espírito Santo levou ao isolamento de um sesquiterpeno ambrosanoli-10,11-diol (38), da cumarina escopoletina (39) e dos esteroides  $\beta$ -sitosterol (40) e estigmasterol (41) (FIGUEIREIDO, 2010), Apresentou atividade antimicrobiana frente aos microrganismos *Streptococcus salivarius* e *Streptococcus mutans* com  $IC_{50}$  abaixo de 100  $\mu\text{g/mL}$ , não apresentaram atividade contra às larvas de *Aedes aegypti*.

De uma espécime de *T. silvatica* coletado em Mato Grosso do Sul, levou ao isolamento de oito compostos, destacando-se esteroides do tipo pregnano e aromandandreno 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,4 $\beta$ -tri-hidroxipregnan-16-ona (42), 2 $\beta$ ,3 $\beta$ ,4 $\beta$ -tri-hidroxipregnan-16-ona (43) e cneurubina X (44), diterpenos bicíclicos do tipo clerodano Kolavelool (45) e Kolavenol (46), além do  $\gamma$ -tocoferol (47), 3-O- $\beta$ -D-glucopiranosil-  $\beta$ -sitosterol (48) e 3-O- $\beta$ -D-glucopiranosil-estigmasterol (49) (SOARES et. al., 2014).

O estudo das folhas de uma espécime coletada na Bahia, resultou no isolamento do  $\alpha$ -tocoferol (50), sesquiterpenos 2S,3S,6R,7R-humuleno-2,3,6,7-diepóxido (51), 2R,3R,6R,7R-humuleno-2,3;6,7-diepóxido (52) e mustacona (16), esteróide  $\beta$ -sitosterol (40) e uma mistura de triterpenos  $\alpha$ -amirina (54),  $\beta$ -amirina (55) este apresenta potencial a anti-inflamatorios, pseudotaraxasterol (56) e lupeol (57) (SOARES et. al., 2013).

O nosso grupo de pesquisa realizando estudos para avaliação do efeito do extrato metanólico obtido das folhas, cascas e flores de *T. silvatica* coletadas em Dourados-MS, sobre atividade inseticida na *Spodoptera frugiperda*, demonstraram que o extrato obtido das folhas foi o mais promissor, diminuindo a viabilidade da larva, prolongou a duração larval, afetou a biomassa pupal, diminuiu o período de oviposição e o número de ovos, bem como afetou a viabilidade do ovo. Este efeito pode estar associado ao teor de constituintes fenólicos (53,17 mg de ácido gálico/ g de extrato) e flavonoides (53.17 mg de quercetina/ g de extrato), além dos constituintes  $\alpha$ -tocoferol (50), 3-O- $\beta$ -D-glucopiranosil-  $\beta$ -sitosterol (48), mustacona (53) e a N-metilprolina (58) observados no extrato metanólico obtidos das folhas (FREITAS et al., 2014; FORMAGIO et al., 2012). Ainda a composição do óleo essencial extraído por hidrodestilação das folhas frescas, evidenciando 35 compostos com predominância de sesquiterpenos, correspondendo a 89.41%. A administração oral do óleo essencial (100 e 300 mg/kg), inibiu significativamente o edema de pata induzido por carragenina e exibiu moderada atividade antioxidante frente ao reagente 2, 2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH) (FREITAS et al., 2014; FORMAGIO et al., 2012).



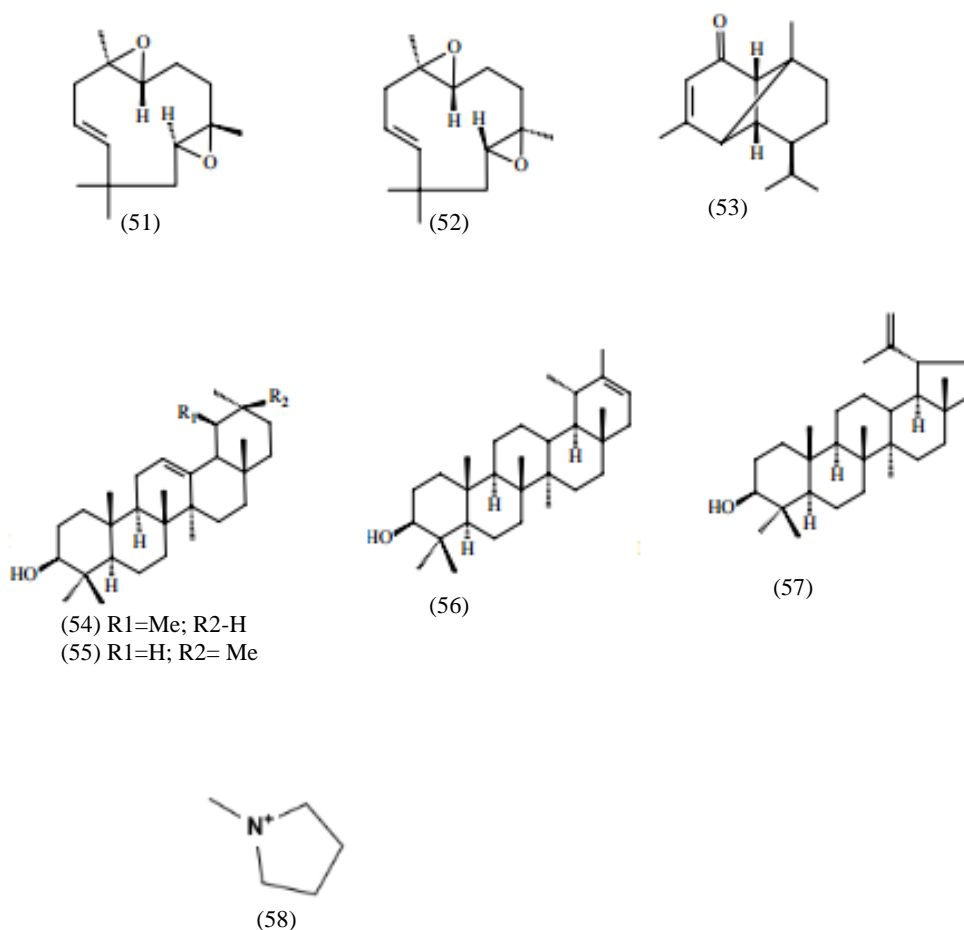


Figura 6. Compostos isolados de extratos alcoólicos obtido das folhas de *T. silvatica*

Diante dos estudos citados, além da indicação popular de espécies do gênero *Trichilia* como anti-inflamatória, *T. silvatica* é uma importante opção para futuros trabalhos de pesquisa, e apesar de existirem alguns trabalhos investigando suas atividades biológicas, ainda não existem dados científicos que comprovem sua eficácia antioxidante e anti-inflamatória.

### 2.3 Estresse oxidativo: radicais livres e antioxidante

O estresse oxidativo decorre de um desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante. Os mecanismos de geração de radicais livres ocorrem, normalmente, na mitocôndria, membranas celulares e no citoplasma. Tais mecanismos podem, especialmente, ser favorecidos pelos íons ferro e cobre. A mitocôndria, por meio da cadeia transportadora de elétrons, é a principal fonte geradora de radicais livres (GREEN et.al. 2004).



### 2.3.1 Geração de radicais livres

A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do metabolismo e, assim, os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica, cujo elétron desemparelhado encontra-se na última camada de valência, apresentam instabilidade química e alta capacidade reativas, nos átomos de oxigênio e nitrogênio são denominadas espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) (VASCONCELOS et al. 2007).

O organismo humano sofre ação constante de ERO e ERN geradas em processos inflamatórios, por alguma disfunção biológica ou proveniente dos alimentos. As principais ERO distribuem-se em dois grupos, os radicais de hidroxila ( $\text{HO}\bullet$ ), superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet -}$ ), peroxila ( $\text{ROO}\bullet$ ) e alcóxila ( $\text{RO}\bullet$ ); e os não-radicais: oxigênio, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso. Dentre as ERN incluem-se o óxido nítrico ( $\text{NO}\bullet$ ), óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ), ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ), nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ), nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) e peroxinitritos ( $\text{ONOO}^-$ ) (CHATGILIALOGLU e O'NEILL, 2001; HALLIWELL, 1999).

Uma importante fonte geradora de radicais livres são as enzimas NADPH oxidases (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidases*). Essas se referem a proteínas transmembrana que têm, por excelência, a função de transferir os elétrons através das membranas celulares, principalmente as membranas endoteliais, com a maior fonte de radical  $\text{O}_2^{\bullet -}$ , estes catalisam a redução de  $\text{O}_2$  e utilizam o NADPH como doador de elétrons (VASCONCELOS et al., 2007).

Tais enzimas existem em pelo menos seis isoformas, diferindo quanto ao local de expressão e co-fatores necessários para a sua ativação (BERNARD and KRAUSE, 2007). Com isso mostram que o NADPH oxidase está diretamente relacionado ao processo de doenças cardiovasculares e inibidores específicos que podem atuar nestas vias com grande potencial no tratamento de doenças relacionadas aos vasodilatadores (RABELO et al. 2010).

A ligação do ferro e cobre às proteínas específicas: transferrina, ferritina e ceruloplasmina, por meio das quais estes são transportados, utilizados e estocados, previne e/ou minimiza as reações de geração de radicais livres catalisadas por esses metais. No citoplasma de células hepáticas, o ferro livre (não ligado à ferritina) é facilmente dissociado na forma de íon, o que o torna cataliticamente ativo e apto para participar de reações de óxido-redução e, conseqüentemente, de geração de radicais livres (KOURY and DONANGELO, 2003; WELCH et al., 2002).

Os ácidos graxos poli-insaturados contidos nas membranas celulares fazem com que essas sejam potentes geradoras de radicais livres, alcoxila ( $LO^*$ ) e peroxila ( $LO_2^*$ ), por meio da lipoperoxidação. Tal processo constitui-se de reações em cadeia, representadas pelas etapas de iniciação, propagação e terminação (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Assim, o excesso desses radicais livres no organismo é combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos da dieta. O desbalanço redox podem desencadear o agravar doenças e entender os mecanismos de estresse oxidativo podem minimizar os efeitos de doenças relacionadas a estes processos, pois quando tratam de indivíduos doentes podem existir diversos aspectos clínicos e nutricionais que devem ser avaliados (VASCONCELOS et al., 2007).

### **2.3.2 Antioxidantes**

De acordo com Halliwell (1999) “*Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo*”. Assim, o sistema de defesa antioxidante tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres ou das espécies reativas não-radicaais. Tais ações podem ser alcançadas por meio de diferentes mecanismos de ação: impedindo a formação dos radicais livres ou espécies não-radicaais (sistemas de prevenção), impedindo a ação desses (sistemas varredores) ou, ainda, favorecendo o reparo e a reconstituição das estruturas biológicas lesadas (sistemas de reparo).

Usualmente, o sistema de defesa é dividido em enzimático e não-enzimático. Ambas podem ser constituídas por grande variedade de substâncias antioxidantes, que podem ter origem endógena. As principais enzimas antioxidantes endógenas são: a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutathiona peroxidase (GPX) e DNA glicosilases atuando na linha primária de defesa basal neutralizando as espécies reativas de oxigênio (EROs). O sistema de defesa exógeno, especialmente, os compostos antioxidantes de origem dietética, entre os quais se destacam: vitaminas, minerais e compostos fenólicos. O ácido ascórbico (vitamina C), o  $\alpha$ -tocoferol e  $\beta$ -caroteno, precursores das vitaminas E e A, respectivamente, são compostos vitamínicos potencialmente antioxidantes (BARBOSA et al., 2010).

### **2.4 Inflamação**

O processo inflamatório é uma resposta localizada e regulada que o organismo dispõe a regular, neutralizar e eliminar um agente agressor (LAWRENCE *et al.*, 2002)

Podendo ser desencadeada por traumas, lesões teciduais e invasão por agentes infecciosos, com a finalidade de eliminar microrganismos e/ou outros agentes irritantes e potencializar o reparo tecidual (MEDZHITOV, 2010). Neste processo ocorre aumento do aporte sanguíneo local por volta da região atingida (lesão local - injúria) e/ou basal/ sistêmica (sepse), acarretando em hiperemia ou rubor, edema, calor, dor e perda da função como sintomas clássicos envolvendo o sistema sanguíneo e sistema imunitário mediante liberação de mediadores químicos pelo organismo como: leucócitos, macrófagos, linfócitos, histaminas, citocinas (fator de necrose tumoral e interleucinas), fator ativador plaquetário, quimiocinas, bradicinina, prostaglandinas, óxido nítrico e leucotrienos (KANTARCI *et al.*, 2005).

A inflamação é dividida em duas categorias, aguda e crônica, de acordo com o tempo de duração e características patológicas. A inflamação aguda apresenta curta duração. Durante o processo inflamatório agudo, muitos mediadores como o óxido nítrico e prostaglandinas como prostaglandina I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>), prostaglandina D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>), prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) e prostaglandina F<sub>2α</sub>. (PGF<sub>2α</sub>) promovem principalmente vasodilatação, um dos sinais clássicos do processo inflamatório agudo, representado pelo calor e rubor característicos da reação inflamatória (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004).

A vasodilatação e formação de exsudato são geralmente acompanhadas da marginação, adesão e migração de leucócitos, principalmente neutrófilos. Na fase aguda da resposta inflamatória, ocorre a liberação de vários mediadores em especial componentes do complemento como os fragmentos C3a e C5a, leucotrienos, quimiocinas como a IL-8 (interleucina 8) e ainda bioprodutos bacterianos como peptídeos N-formilados, que promovem a quimiotaxia de leucócitos e outras células fagocíticas para o sítio da reação inflamatória (aderem e smith, 2004).

A inflamação aguda pode finalizar-se com a resolução de todos os eventos característicos da reação inflamatória e retorno do tecido lesionado à normalidade ou sua substituição por tecido conjuntivo. Esse processo é chamado de resolução da resposta inflamatória e podem estar envolvidas substâncias resolutivas (mediadores) como a Lipoxina, MAPKinase fosfatase, protecninas, resolvinas, dentre outras (GILROY *et al.*, 2004; ADEREM e SMITH, 2004).

O processo inflamatório resulta da liberação de vários mediadores inflamatórios que são substâncias que uma vez liberadas/ativadas desencadeiam mantem e amplificam os

diversos processos envolvidos na resposta inflamatória, como histamina (potente vasodilatador e enzima proteolítica, responsável pela vasodilatação, têm ação rápida e precose, mas de curta duração), serotonina (responsável pela vasodilatação com ações similar as da histamina), leucotrienos (LTs) (produtos da oxidação de ácidos graxos insaturados e sua reação de síntese é iniciada pela liberação de ácido araquidônico (AA), prostaglandinas (PGs) (o ácido araquidônico também pode ser metabolizado pela via da ciclo-oxigenase (COX), mediada por enzimas que catalisam a biosíntese das prostaglandinas), citocinas (moléculas de sinalização polipeptídicas, e os reguladores mais importantes desse processo destacam-se o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e a interleucina 1 (IL-1) (RANG et al., 2007, KUMAR et al., 2005, VERRI et al., 2006).

A inflamação aguda faz parte de uma resposta inata do processo inflamatório do sistema de defesa, mas a inflamação crônica faz parte de um processo mais complexo. Quando a resposta inflamatória aguda não é resolvida pelas citocinas pro e antiinflamatorias resultam em uma inflamação crônica que podem durar anos e podem evoluir para quadros mais graves como cancer, diabetes, doenças cardiovasculares, pulmonares e neurológicas. Na inflamação crônica as células envolvidas são monoculares, macrófagos, linfócitos e plasmocitos são encontrados juntamente com os neutrófilos e ocorre destruição e reparação do tecido (CARNEIRO et al., 2009).

Além destes mediadores inflamatórios, alguns fatores que interferem com a transcrição gênica parecem ser alvos importantes para o controle do processo inflamatório. O fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) destaca-se pela sua vasta gama de ações e pelo fato de diversas proteínas estarem integradas na dinâmica de sua ativação (O'NEILL e KALTSCHMIDT, 1997).

#### **2.4.1 Agentes anti-inflamatórios**

Atualmente, medicamentos encontram-se disponíveis para uso como analgésicos e/ou anti-inflamatórios, como os corticosteróides e os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs).

1. Anti-inflamatórios hormonais ou esteroidais conhecidos como: glicocorticóides, corticóides ou corticosteróides que agem na produção das prostaglandinas e leucotrienos tendo como exemplo: hidrocortisona, dexametasona, prednisona;
2. Anti-inflamatórios não-hormonais ou inibidores da enzima ciclo-oxigenase (COX) chamados ou anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) que estão envolvidos na

inibição específica da COX e conseqüentemente a redução da conversão do AA em PGs. Os AINEs tradicionais como naproxeno, ibuprofeno, diclofenaco, indometacina, flurbiprofeno, nabumeton e aspirina inibem ambas as isoformas de COX, classificados como anti-inflamatórios não seletivos. Por atuarem nas duas isoformas, reduz a inflamação por inibir a COX-2 que são altamente seletivos, mas causa efeitos secundários gastrointestinais por inibirem a COX-1 (KUMMER e COELHO, 2002; DUNCAN et al. 2004; NETINA, 2003; SMELTZER e BARE, 2002; SOUZA, 2013).

Apesar destas classes de substâncias (AINEs e corticosteróides) apresentarem excelentes propriedades anti-inflamatórias e ser utilizado na terapêutica clínica, seu uso produz importantes efeitos colaterais. Tais efeitos incluem irritação gástrica que podem variar desde um simples desconforto até a formação de úlcera. Reações cutâneas variando de leves até mais graves e potencialmente fatais como a síndrome de Stevens-Johnson. Efeitos renais podendo causar insuficiência renal aguda, nefropatia analgésica pelo uso crônico. Outros efeitos menos comuns podem afetar o SNC, distúrbios da medula óssea e alterações hepáticas, porém se já houver comprometimento renal (CECIL, 2005).

Assim, tanto a academia quanto a indústria farmacêutica têm voltado sua atenção aos produtos naturais, na busca de um fármaco efetivo no tratamento das doenças inflamatórias e com efeitos adversos reduzidos.

Vários medicamentos anti-inflamatórios utilizados na terapêutica foram desenvolvidos a partir de plantas a se citar: o Acheflan® obtido da *Cordia Verbenacea*, nativa do Brasil, presente na mata atlântica, que atua no bloqueio da enzima ciclo-oxigenase-2 inibindo a produção das prostaglandinas (PASSOS et al. 2007). Védica® medicamento que atua no combate a inflamações intestinais obtido a partir da *Boswellia serrata*, (GAYATHRI et al., 2007; SADIQ et al. 2014) entre outros.

### **3 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE ORIGEM VEGETAL: EFEITO ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIO**

#### **3.1 Compostos fenólicos**

Os compostos fenólicos são estruturas químicas que apresentam hidroxilas e anéis aromáticos, nas formas simples ou de polímeros, que os confere o poder antioxidante. Esses compostos podem ser naturais ou sintéticos. Quando presentes em vegetais podem estar em formas livres ou complexadas a açúcares e proteínas, sendo essenciais para o seu crescimento

e reprodução, além disso se formam em condições de estresse como, infecções, fermentos, radiações UV, dentre outros. Quimicamente, os fenólicos são definidos como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais, destacando os flavonóides, os ácidos fenólicos, os taninos e os tocoferóis.

A classe dos ácidos fenólicos está dividida em três grupos, sendo uma composta pelos ácidos hidroxibenzóicos, que possuem sete átomos de carbono (C6-C1) onde estes são os mais simples encontrados na natureza, como exemplo: o ácido gálico, vanílico, protocatecuico, p-hidroxibenzóico e sirínico. O outro grupo é constituído pelos ácidos hidroxicinâmicos, que possuem nove átomos de carbono (C6-C3), sendo sete os mais comumente encontrados no reino vegetal. Como exemplo temos: o ácido caféico, ferúlico, p-cumárico e sinápico. Outro grupo é o das cumarinas que são metabólitos secundários derivados do ácido cinâmico por ciclização da cadeia lateral do ácido *o*-cumárico (Figura 7) (BRAVO, 1998; SOARES, 2003).

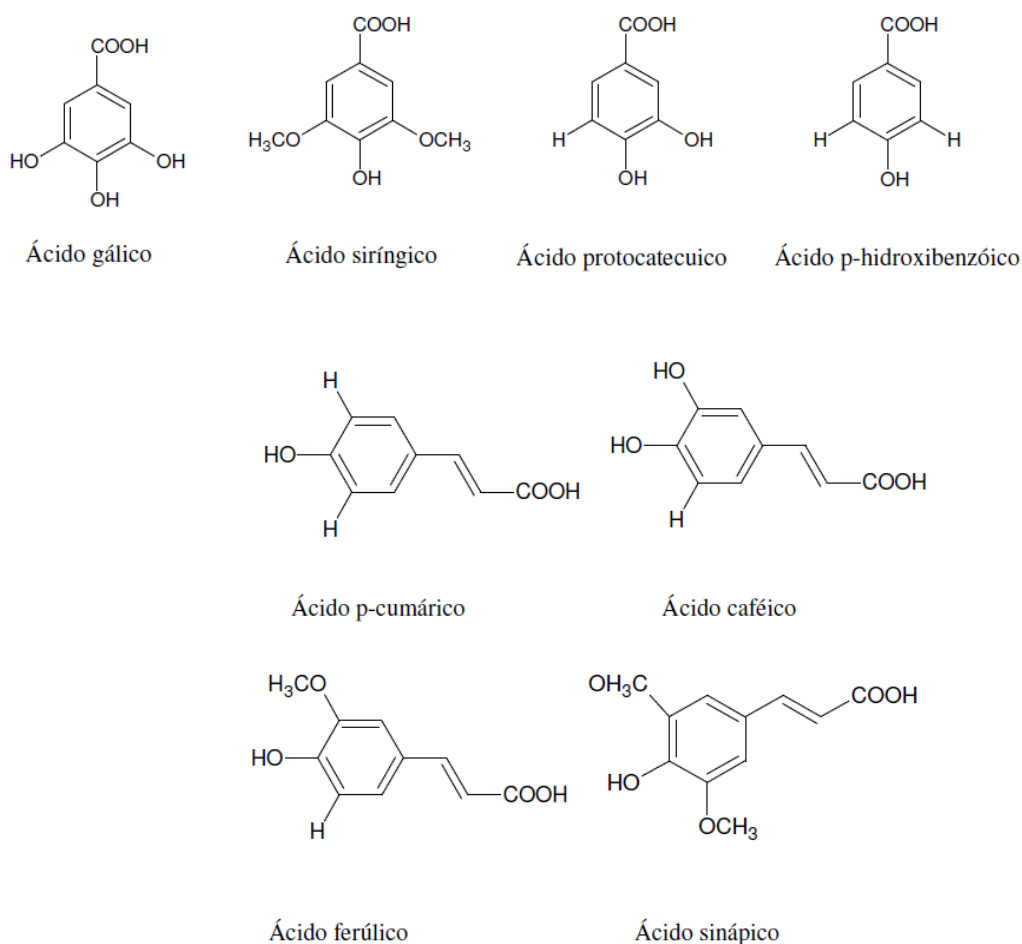


Figura 7-Alguns exemplos de ácido fenólicos.

Os flavonóides são compostos largamente distribuídos no reino vegetal, encontram-se presentes em frutas, folhas, sementes e em outras partes da planta na forma de glicosídeos ou agliconas. São compostos de baixo peso molecular, consistindo em 15 átomos de carbono, organizados na configuração C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> (GONÇALVES, 2007). A estrutura química dos flavonoides consiste em dois anéis aromáticos, denominados A e B, unidos por três carbonos que formam um anel heterocíclico, denominado anel C (Figura 8). O anel aromático A é derivado do ciclo acetato/ malonato, enquanto o anel B é derivado da fenilalanina. Variações em substituição do anel C padrão resultam em importantes classes de flavonóides, como antocianidinas, flavona, flavonol, flavanona (Figura 8) (BALASUNDRAM et.al., 2006;; MERKEN e BEECHER, 2000).

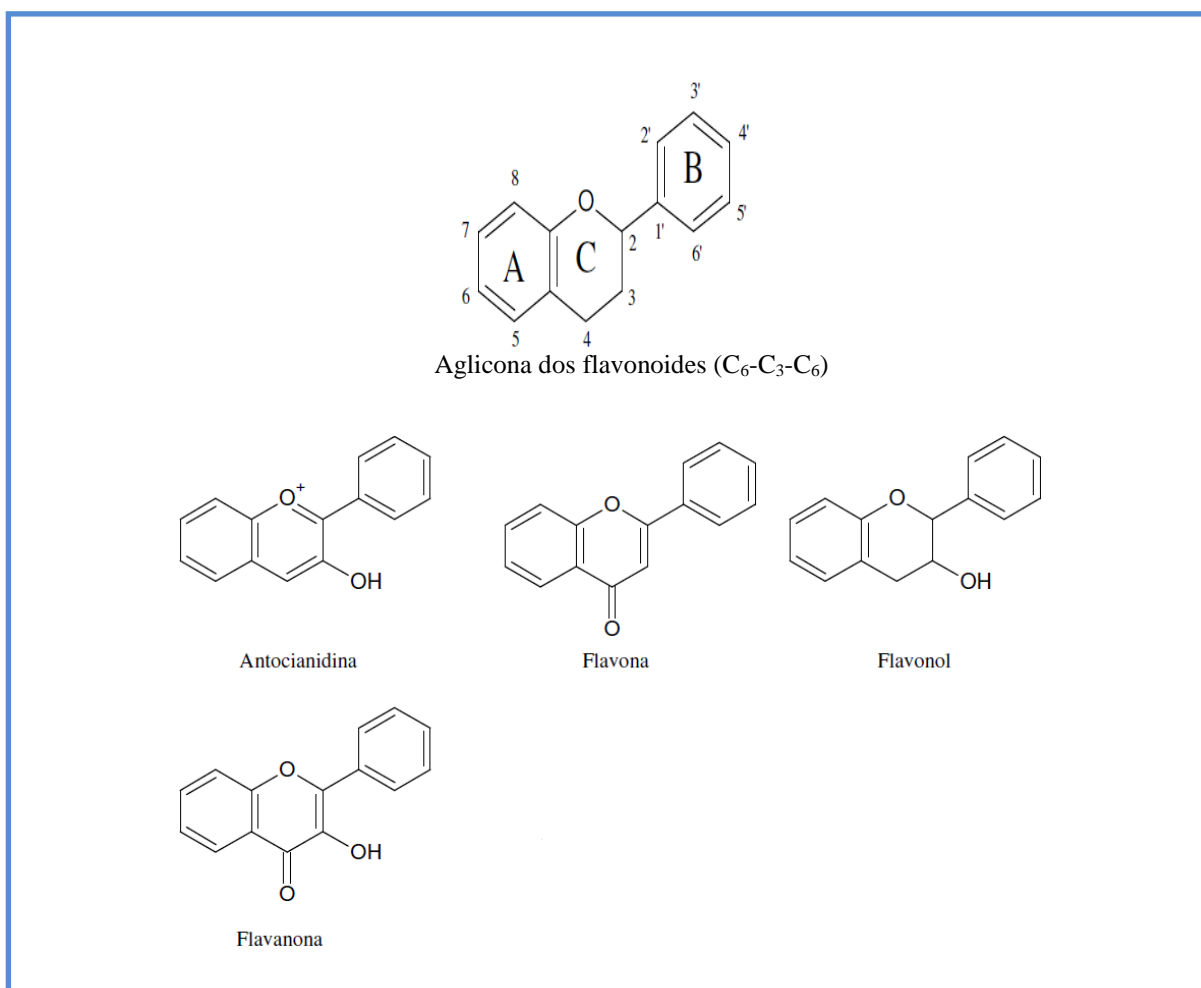


Figura 8-Estrutura da aglicona de sub-classes de flavonóides

Os taninos são substâncias que apresentam a propriedade de se associar e de se combinar com proteínas e com certos polióis, sendo esta a base das propriedades tanantes exercida por esta classe de compostos, agindo sobre o colágeno da pele dos animais ao cabo de sua transformação em couro são classificados, de acordo com sua origem biossintética, em dois grupos: os taninos hidrolisáveis, encontrados em dicotiledôneas lenhosas e herbáceas, que são caracterizadas por um núcleo (glucose) esterificado com ácidos gálicos (galotaninos), e ácidos elágicos (elagitaninos), formado a partir da rota metabólica do ácido chiquímico e os taninos condensados ou proantocianidinas, derivados do metabolismo de fenilpropanoides (MONTEIRO, 2005).

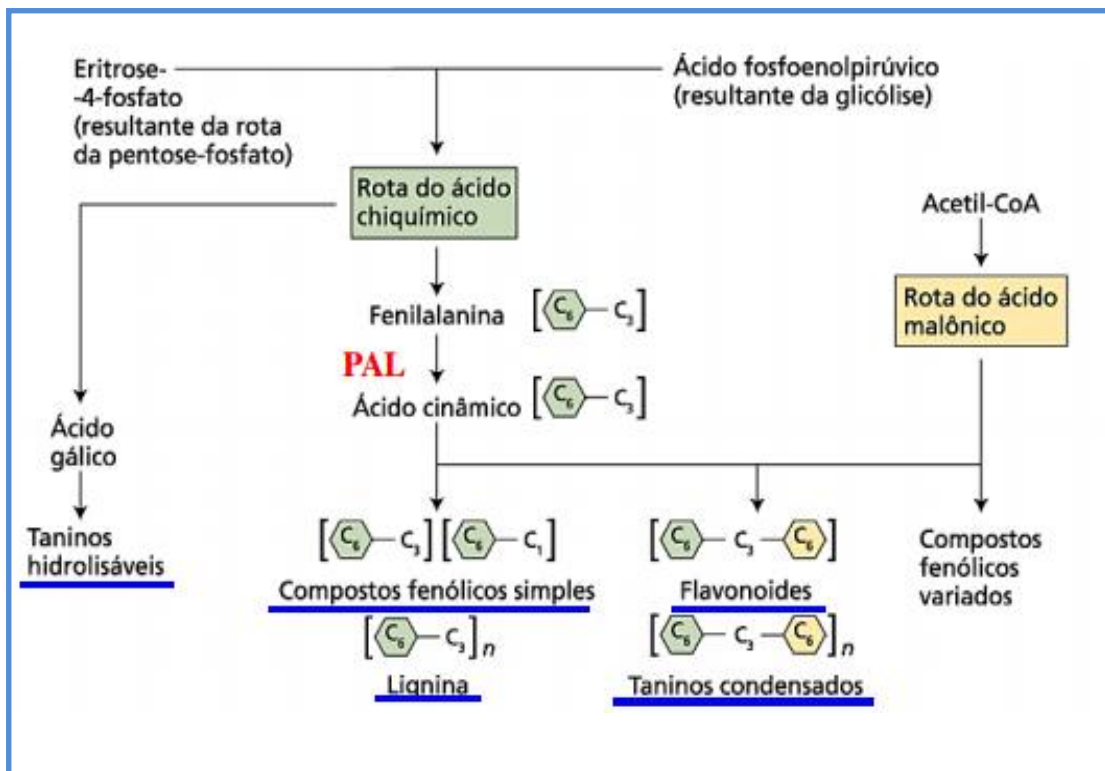


Figura 9. Rota Biossintética dos taninos Hidrolisáveis e condensados a partir do ácido chiquímico.



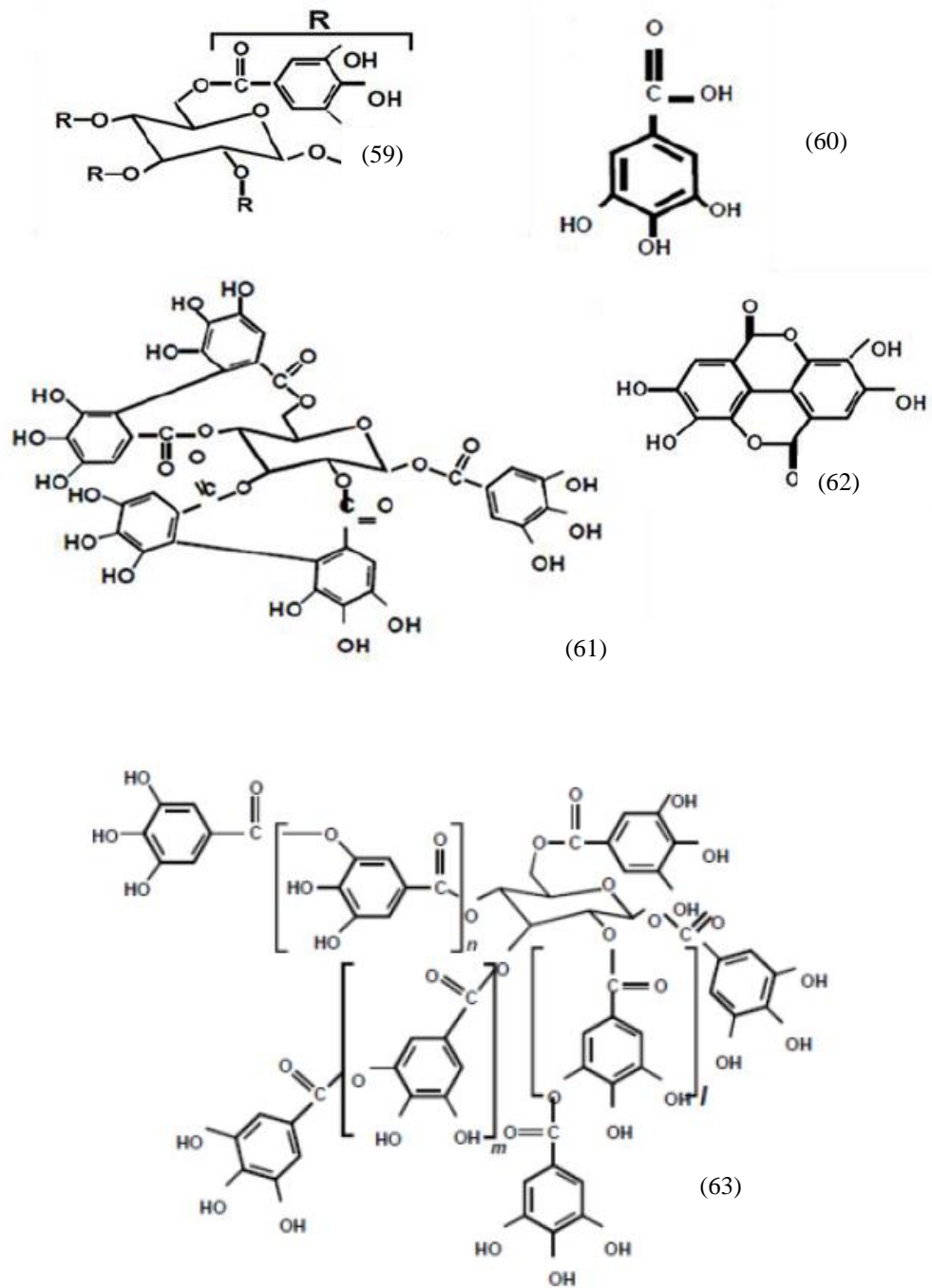


Figura 10. Estrutura química de alguns Taninos Hidrolisáveis. (59) estrutura química dos galotaninos; (60) estrutura química do ácido gálico; (61) estrutura química do ácido elágico; (62) estrutura química do elagitaninos; (63) ácido tânico.

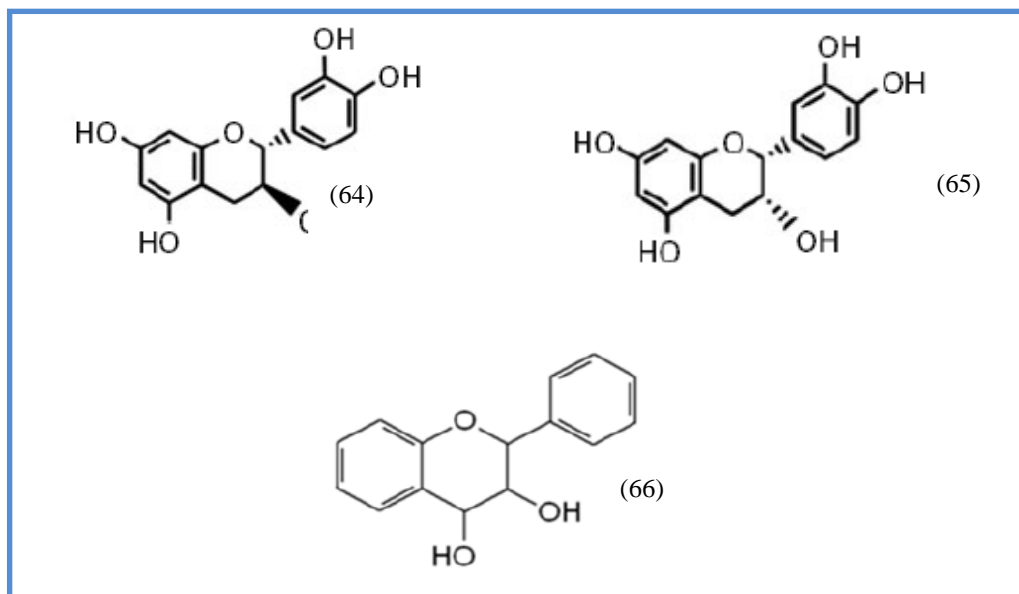


Figura 11. Estrutura química de alguns taninos condensados: (64) catequina; (65) epicatequina e (66) leucoantocianidina.

Ácidos fenólicos, flavonoides e taninos tem a capacidade de sequestrar espécies reativas, como o oxigênio singlete, radical hidroxila e podem estar ligados com outro ácido fenólico ou estar sob a forma livre, demonstrando potente atividade antioxidante e anti-inflamatória (MARINOVA e YANISHLIEVA, 2003, SUN *et al.*, 2007).

## 4 OBJETIVOS

### OBJETIVO GERAL

- Avaliar a capacidade antioxidante, anti-inflamatória, anti-proliferativa e o perfil fitoquímico do extrato metanólico obtido a partir das cascas e folhas de *Trichilia silvatica*.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar o teor de fenóis totais, flavonoides, flavanol, taninos condensados do extrato metanólico das folhas e cascas de *T. silvatica*;
- Realizar o perfil fitoquímico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) do extrato metanólico das folhas e cascas de *T. silvatica*;
- Avaliar a capacidade antioxidante pelos ensaios DPPH, ABTS, ácido linoléico-  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico do extrato metanólico obtido a partir das cascas e folhas de *Trichilia silvatica*.
- Avaliar a capacidade anti-inflamatória no edema agudo de pata, pleuresia e aumento da mieloperoxidase induzido por carragenina em camundongos do extrato metanólico obtido a partir das cascas e folhas de *Trichilia silvatica*.
- Avaliar a capacidade anti-proliferativa *in vitro* pelo método sulforrodamina B em 11 linhagens de células tumorais.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEREM, Alan; SMITH, Kelly D. A systems approach to dissecting immunity and inflammation. In: **Seminars in immunology**. Academic Press, p. 55-67, 2004.

ALADESANMI, A.J.; ODEDIRAN, S.A. Antimicrobial activity of *Trichilia heudelotti* leaves. **Fitoterapia**, v.71, p. 179-182, 2000.

ARENAS, C.; RODRIGUEZ-HAHN, L. Limonoids from *Trichilia havanensis*. **Phytochemistry**, v. 29, n.9, p. 2953-2956, 1990.

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

BANKOLE, A.E.; ADEKUNLE, A. A.; SOWEMIMO A. A.; UMEBESE, C. E; ABIODUN, O.; GBOTOSHO, G. O. Phytochemical screening and in vivo antimalarial activity of extracts from three medicinal plants used in malaria treatment in Nigeria. **Parasitology Research**, v. 115, n.1, p. 299-305 2016. DOI 10.1007/s00436-015-4747-x.

BARBOSA K. B. F.; COSTA N. M. B.; ALFENAS R. C. G.; DE PAULA S. O.; MINIM4 V. P. R.; BRESSAN J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v.23, n.4, p.629-643, 2010.

BENENCIA, F.; COURRÈGES, M. C.; COULOMBIÉ, F. C. Anti inflammatory activities of *Trichilia glabra* aqueous leaf extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v.71, p. 293–300, 2000.

BERNARD, K; KRAUSE KH. The NOX family of ROS generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiological Reviews**, v.87, n.1, p.245-313, 2007.

BOGORNI, P. C.; VENDRAMIM, J. D. Bioatividade de extratos aquosos de *Trichilia* spp. sobre *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho. **Neotropical Entomology**, v. 32, n.4, p. 665-669, 2003.

BOGORNI, P. C.; VENDRAMIM, J. D. Efeito subletal de extratos aquosos de *Trichilia* spp. sobre o desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho. **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 2, p. 311-317, 2005.

BONASSOLI, V. T.; CHASSOT, J. M.; LONGHINI R., MILANI, H.; MELLO, J. C. P.; OLIVEIRA, R. M. W. Subchronic administration of *Trichilia catigua* ethyl-acetate fraction promotes antidepressant-like effects and increases hippocampal cell proliferation in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.143, p.179–184, 2012.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. **Nutrition Reviews**, v.56, n.11, p. 317-333, 1998.

BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v.33, n.1, p.229-239, 2010.

BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal of natural products**, v. 67, n. 12, p. 2141-2153, 2004.

CALA, A. C.; CHAGAS, A. C. S.; OLIVEIRA, M. C. S.; MATOS, A. P.; BORGES, L. M. F.; SOUSA, L. A. D.; SOUZA, F. A.; OLIVEIRA, G. P. In vitro anthelmintic effect of *Melia azedarach* L. and *Trichilia clausenii* C. against sheep gastrointestinal nematodes. **Experimental Parasitology**, v. 130, p. 98-102, 2012

CARNEIRO, P.S. **Análise da expressão diferencial dos genes envolvidos na resposta inflamatória aguda e crônica e sua influência na carcinogênese química cutânea em camundongos geneticamente selecionados para alta e baixa reatividade inflamatória aguda**. 2009. 165 f. Tese (Doutorado em Imunologia. Universidade de São Paulo. 2008.

WIESE, L. P. L. **Avaliação de atividade antioxidante e antiinflamatória de extrato e frações de *Alternanthera tenella* Colla**. 79 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia). Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.

CASTELO-BRANCO, V. N; TORRES, A. G. Capacidade antioxidante total de óleos vegetais comestíveis: determinantes químicos e sua relação com a qualidade dos óleos. **Revista de Nutrição**, v. 24, n. 1, 2011.

CECIL, R. F. **Tratado de Medicina Interna**. 22ª edição. Rio de Janeiro, RJ. Elsevier, Vol.2. 2005.

CHASSOT, J.M., LONGHINI, R.; GAZARINI, L.; MELLO, J. C. P.; OLIVEIRA, R. M. W.. Preclinical evaluation of *Trichilia catigua* extracts on the central nervous system of mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.137, p.1143– 114, 2011.

CHATGILIALOGLU, C.; O'NEILL, P. **Free radicals associated with DNA damage**. **Experimental Gerontology**, v.36, p.1459–1471, 2001.

CORTEZ DAG, VIEIRA PC, FERNANDES JB, DA SILVA MFGF, FERREIRA AG. Limonoids from *Trichilia hirta*. **Phytochemistry**, v.31 p. 625-628, 1992.

CORTEZ, D.A.G., FERNANDEZ, J. B., VIEIRA, P.C., SILVA, M.F.G.F., FERREIRA, A.G. A limonoid from *Trichilia stipulata*. **Phytochemistry**, v.55, p.711-713, 2000.

COSTA-LOTUFO, L. V. et al. A Contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no laboratório nacional de oncologia experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.

DUNCAN, B.B; SCHIMIDT, M.I; GIUGLIANI, E.R.J. **Medicina Ambulatorial, condutas baseadas em evidências**. 3ª ed. Porto Alegre-RS: Artemd, 2004.

ELDEEN, I.M.S., HEERDEN, F.R., STADEN, J. Biological activities of cycloart-23-ene-3, 25-diol isolated from the leaves of *Trichilia dregeana*. **South African Journal of Botany**, v.73, p.366–371, 2007.

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.

FIGUEREDO, E.R. **Estudo fitoquímico e avaliação biológica dos extratos de *Trichilia casarettii* E *Trichilia silvatica* (meliaceae)**. 2010. 167 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2010.

FORMAGIO, A. S.N; KASSUYA, C. A. L.; NETO, FREDERICO FORMAGIO; VOLOBUFF, C. R. F.; IRIGUCHI, E. K. K.; VIEIRA, M. C.; FOGLIO, M. A. **The flavonoid content and antiproliferative, hypoglycaemic, anti-inflammatory and free radical scavenging activities of *Annona dioica* St. Hill**. **BMC- Complementary E Alternative Medicine**, v.13, p. 2-8, 2012.

FREITAS, A. F. et al. Effect of extract of *Trichilia silvatica* C.DC. on development and reproduction parameters of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n.20, p. 2041-2049, 2014.

GARCEZ, F.R., W.S. GARCEZ, M.T. TSUTSUMI, Roque N.F. Limonoids from *Trichilia elegans* ssp. *elegans*. **Phytochemistry**, v. 45, p.141-148, 1997.

GARCEZ, F.R., WALMIR S. GARCEZ, NÔÂDIA F. ROQUE, EDUARDA E. CASTELLANO, JULIO ZUKERMAN-SCHPECTOR. 7b-Oxygenated limonoids from *Trichilia elegans* ssp. *Elegans*. **Phytochemistry**, v..55, p.733-740, 2000.

GARIMA, G. *Trichilia connaroides* Wight and Arnott: ethnobotany, phytochemistry and pharmacology. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 9, p. 241–248, 2011.

GAYATHRI, B; MANJULA, N.; VINAYKUMAR, K.S.; LAKSHMI, B.S.; BALAKRISHNAN, A. Pure compound from *Boswellia serrata* extract exhibits anti-inflammatory property in human PBMCs and mouse macrophages through inhibition of TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , NO and MAP kinases. **International Immunopharmacology**, v. 7, p. 473–482, 2007.

GENG, ZHAO-LIANG; FANGA, XIN; DIA, YING-TONG; ZHANGA, QIANG; SHENA, YUE-MAO AND HAOA, XIAO-JIANG. A New Limonoid from *Trichilia connaroides*. **Zeitschrift für Naturforschun**, v.65b, p.762-764, 2010.

GERMANÒ. M.P.V.; D'ANGELO A, T.; BIASINI A, R.; SANOGO B, R.; DE PASQUALE A, S. C. Evaluation of the antioxidant properties and bioavailability of free and bound phenolic acids from *Trichilia emetica* Vahl. **Journal of Ethnopharmacology**, v.105, p.368–373, 2006.

GILROY, D. W. et al. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. **Nature reviews Drug discovery**, v.3, n.5, p.401-416, 2004.

GONÇALVES, R. **Estudo da inibição de tripsina por compostos fenólicos isolados de fontes naturais. Efeito anti nutricional de bebidas comuns**. 2007. 128 folhas. Tese de mestrado. Departamento de Química da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. Escola de Engenharia da Universidade do Minho.2007.

GREEN K, BRAND MD, MURPHY MP. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. **Diabetes**, v.53, p.110-8, 2004.

GULCIN, I.; OKTAY, M.; KIRECCI, E.; KUFREVIOGLU, O. I. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. **Food Chemistry**, v.83, n.3, p.371-382, 2003.

HALLIWELL, B. Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: measurement, mechanism and the effects of nutrition. **Mutation Research**, v.443, n. (1-2), p.37-52, 1999.

HILARIO, Maria Odete Esteves; TERRERI, Maria Teresa; LEN, Cláudio Arnaldo. Antiinflamatórios não-hormonais: inibidores da ciclooxigenase 2. **Journal of Pediatrics**, v.82, n.5, p.206-S212, 2006.

JI, K.; ZHANG, P.; LI, X.; GUO, J.; HU, H.; XIAO, C.; XIE, X.; XU, Y. Cytotoxic limonoids from *Trichilia americana* leaves. **Phytochemistry**, v.118, p.61-67, 2015.

KANTARCI, N.; BORAK, F.; ULGEN, K. O. Bubble column reactors. **Process Biochemistry**, v.40, n.7, p.2263-2283, 2005.

KONATÉ, K.; KASSI, Y.; OKSANA, S.; MARIAN, B. Antidiarrheal and antimicrobial profiles extract of the leaves from *Trichilia emetica* Vahl. (Meliaceae). **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p.5, v.3, p.242-248, 2015.

KOURY, J.C.; DONANGELO, C.M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Revista de Nutrição**, v.16. n.4, p.433-41, 2003.

KUMAR, R.S., et al. Antioxidant and antimicrobial activities of *Bauhinia racemosa* L. stem bark, **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 38 (2005), 10015-1024.

KUMMER, C. L.; COELHO, T. C. R. B. Antiinflamatórios não esteróides inibidores da ciclooxigenase-2 (COX-2): aspectos atuais. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v.52, n.4, p. 498-512, 2002.

LAWRENCE, T; WILLOUGHBY, D.A.; GILROY, D.W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v.2, n.10, p.787-95, 2002.

LI, J.W. H.; VEDERAS, J. C. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? **Science**, v. 325, n. 5937, p. 161-165, 2009.

LUSHCHAK, V.I., Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-Biological Interactions**, v.224, p.164–175, 2014.

MACIEL, M.A.M; PINTO, A.A.; VEIGA, V.F. Plantas Medicinais: a necessidade de Estudos Multidisciplinares **Química Nova**, v.25, p.429-438, 2002.

MARINOVA, E. M.; YANISHLIEVA, N. V. Antioxidant activity and mechanism of action of some phenolic acids at ambient and high temperatures. **Food Chemistry**, v. 81, p.189-197, 2003.

MATOS, A. P. et al. Atividade biológica dos extratos de fungos e sementes de *Trichilia* spp. sobre *Spodoptera frugiperda*: limonóides de *T. catigua*. In: **30th Annual Convention of Brazilian Society of Chemistry**, Águas de Lindóia City, São Paulo State. 2007.

MEDZHITOV R.. Inflammation: new adventures of an old flame. **Cell** **140**, p.771-776, 2010.

MERKEN, H. M.; BEECHER, G. R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, n.3, p.577-599, 2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. BRASIL. MONOGRAFIA DA ESPÉCIE *Harpagophytum procumbens* DC. ex Meissn. ("GARRA-DO-DIABO"). 142 páginas. Brasília 2015.

MONTEIRO, JULIO MARCELINO et al. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v.28, n.5, p. 892-896,2005.

MULHOLLAND, A.D.; TAYLOR, D.A.H. Limonoids from the seed of the natal mahogany, *Trichilia dregeana*. **Phytochemistry**., v.19, p. 2421-242, 1980.

MUSZA, L.L.; KILLAR, L.M., SPEIGHT, P., BARROW, C.J., GILLUM, A.M., AND COOPER, R. Minor Limonoids from *Trichilia rubra*. **Phytochemistry**, v.39, n. 3, p.621-624, 1995.

NAKATANI, M., IWASHITA, T., NAOKI, H.; HASE, T. Structure of a Limonoid antifeedant from *Trichilla roka*. **Phytochemistry**, v.24, n.1, p.195-196, 1985.

NETTINA, S.M. **Prática de Enfermagem**, volume 3, 7ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2003.

NORES, M.N., COURRÈGES, M.C., BENENCIA, F., COULOMBIÉ, F.C. Immunomodulatory activities of *Cedrela lilloi* and *Trichilia elegans* aqueous leaf extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, Volume 55, Issue 2, January 1997, Pages 99-106.

OLUGBADE, Tiwalade A. Tetracyclic triterpenoids from *Trichilia prieuriana* leaves. **Phytochemistry**, v.30, n.2, p. 698-700, 1991.

O'NEILL, L. A. J.; KALTSCHMIDT, C. NF-kB: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. **Trends in Neurosciences**, v.20, n.6, p.252-258, 1997.

PASSOS, G.F; FERNANDES, E.S.; CUNHA, F.M.; FERREIA, J.; PIANOWSKI, L.F.; CAMPOS, M.M.; CALIXTO, J.B. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **Journal of Ethnopharmacology**. v.110, n.2, p.323-33, 2007.

PATRÍCIO, P. C.; CERVI, A. C. O gênero *Trichilia* P. Browne (Meliaceae) no Estado do Paraná, Brasil. **Acta Biológica Paranaense**, v.34, p.27-71, 2005.



PENNINGTON, T. D. **Flora Neotropica: Meliaceae**. 470 f. Monograph 28. New York, NY: New York Botanical Garden, 1981.

PUPO, M.T.; VIEIRA, P.C.; FERNANDEZ, J.B.; SILVA, M.F.G.F. A Cycloartane Triterpenoid and to-phenyl alkanolic and alkenolic acids from *Trichilia clausenii*. **Phytochemistry**, v.42, n. 3, p. 795-798, 1996.

PUPO, M.T.; VIEIRA, P.C.; FERNANDEZ, J.B.; SILVA, M.F.G.F. Lactones from *Trichilia Clausenii*. **Phytochemistry**, v.48, n.2, p.307-310, 1998.

RABELO, L. A.; SOUZA, V. N.; FONSECA, L. J. S.; SAMPAIO, W. O. Desbalanço Redox: NADPH Oxidase como um Alvo Terapêutico no Manejo Cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.94, n.5, p.684-693, 2010.

RANG, H. P. et al. Farmacologia. 6ª edição. **Tradutores: Patrícia Lydie Voeux**, 2007.

ROEL, A. R.; VENDRAMIM, J. D. Desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) em genótipos de milho tratados com extrato acetato de etila de *Trichilia pallida* (Swartz). **Scientia Agricola**, v.56, p.581-586, 1999.

SADIQ, U.; UMAR, K.; SARWAR, A.H.M.G.; KHAN, A.; AHMAD, N.; AHMAD, N.; KATYIAR, C.K.; HUSAIN, S.A.; KHAN, H.A. *Boswellia serrata* extract attenuates inflammatory mediators and oxidative stress in collagen induced arthritis. **Phytomedicine**, v.15, p.847-856, 2014.

SANGALLI, A; VIEIRA, M. C. Plantas medicinais utilizadas por parte da população de Dourados-MS. **Cerrados**, v. 6, n. 11, 2003.

SANOGO, R.; GERMANÒ, M. P.; D'ANGELO, V.; FORESTIERI, A. M.; RAGUSA, S.; RAPISARDA, A. *Trichilia roka* Chiov. (Meliaceae): pharmacognostic researches. **II Farmaco**, v.56, 357-360, 2001.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v.18, n.3, p.385-405, 2004.

SIMMONDS, M.S.J., STEVENSON, P.C., PORTER, E.A. & VEITCH, N.C. Insect antifeedant activity of three tetranortriterpenoids from *Trichilia pallida*. **Journal of Natural Product**, v.64, p. 1117-1120, 2001.

SMELTZER, S. C.; BARE B.G.; **Tratado de Enfermagem Médico Cirúrgico**. Vol.2. 8ª Ed. Rio de Janeiro, 2002. Editora Guanabara Koogan.

Soares, A. O.; Ferreira, A. G. L.; Soares, L. R.; Corsino, J.; Garcez, F. R.; Garcez, W. S. Estudo químico das folhas de *Trichilia silvatica* (Meliaceae). **Química Nova**, v.37, n.9, p.1487-1490, 2014.

SOARES, D. G.; ANDREAZZA, A. C.; SALVADOR, M. Sequestering Ability of Butylated Hydroxytoluene, Propyl Gallate, Resveratrol, and Vitamins C and E against ABTS, DPPH,

and Hydroxyl Free Radicals in Chemical and Biological Systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 10, p.1077-1080, 2003.

SOUZA, ALEXSANDRA VILA MAIOR DE. **Atividade anti-inflamatória do extrato, de frações, do alcalóide dicentrinona obtidos de *Duguetia furfuracea* (St. Hil) em camundongos**. 2013. Dissertação (Mestrado em ciências da saúde). Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2013.

SUN J, CHU Y-F, WU X, LIU RH. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. **Journal of the Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.7449-7454, 2002.

VIEIRA-SILVA, J. (2015a) Tronco da espécie *Trichilia silvatica* 1 fot. Color 10, 66 x7,99 cm.

VIEIRA-SILVA, J. (2015b) **Folhas da espécie *Trichilia silvatica*** 1 fot. Color 6,35x8,44 cm

VERRI, Waldiceu A. et al. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? **Pharmacology & therapeutics**, v.112, n.1, p.116-138, 2006.

WELCH KD, DAVIS TZ, EDEN MEV, AUST SD. Deleterious iron-mediated oxidation of biomolecules. **Free Radical Biology & Medicine**, v.32, n.7, p.577-83, 2002.

WIESE, L. P. L. **Avaliação de atividade antioxidante e antiinflamatória de extrato e frações de *Alternanthera tenella* Colla**. 79 f. Dissertação (Mestrado em Farmacia). Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.

XIE, Y.S., ISMAN, M.B., GUNNING, P., MACKINNON, S., ARNASON, J.T., TAYLOR, D.R., SANCHEZ, P., HASBUN, C., AND TOWERS, G.H.N. Biological Activity of Extracts of *Trichilia* Species and the Limonoid Hirtin against Lepidopteran Larvae. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.22, n.2, p. 129-136, 1994.

XU, J.B., LIN, Y., DONG, S.H., WANG, F., YUE, J.M. Trichinenlides A-T, mexicanolide-type limonoids from *Trichilia sinensis*. **Journal of Natural Products**, v.76, p.1872–1880, 2013.

## 6. APÊNDICE

### Artigo 1: Journal of Fitoterapia MEDICINA II: Qualis B1.

<https://www.elsevier.com/journals/fitoterapia/0367-326x/guide-for-authors>

#### Manuscript Details

<b>Manuscript number</b>	FITOTE_2018_659
<b>Title</b>	Anti-inflammatory and antiproliferative activities of the extracts from <i>Trichilia silvatica</i> (C.DC)
<b>Article type</b>	Research Paper

#### Abstract

*Trichilia silvatica*, popularly known as “catiguá-branco”, is distributed in Brazil (Mato Grosso do Sul), and members of this genus are commonly used for the treatment of rheumatism (arthritis). The aim of this research was to investigate the anti-inflammatory, antiproliferative and antioxidant activities of the leaves (MEL-TS) and bark (MEB-TS) of *T. silvatica*. We also evaluated the concentrations of phenolic compounds, condensed tannins, flavonoids, flavonols and HPLC/PDA analysis. MEL-TS and MEB-TS were analysed by LC-PDA, and the results revealed the presence of caffeic acid in both extracts, showed high total phenolics concentrations ( $270.8 \pm 17.10$  mg GAE/ g extract and  $278.8 \pm 25.13$  mg GAE/g extract, respectively), and content of flavonoids in MEL-TS ( $209.30 \pm 2.91$  mg QE/g extract). In the antioxidant tests, MEL-TS and MEB-TL exhibited moderate scavenging activities with IC<sub>50</sub> values  $\leq 35.32$   $\mu$ g/mL in lipoperoxidation. Both extracts (30-300 mg/kg) inhibited oedema induced by carrageenan at 2 h and 4 h after carrageenan induction and inhibited leukocyte migration at 6 h post administration. MEL-TS and MEB-TL (100 and 300 mg/kg) did not impact zymosan-induced arthritis. Finally, MEL-TS were particularly effective against VERO and PC-3 cell line resulting in GI<sub>50</sub>  $\leq 0.22$   $\mu$ g/mL. Overall, the results indicated that the leaves and bark from *T. silvatica* exhibit anti-rheumatic potential and anti-inflammatory activity, which has contributed in part to the traditional use of this plant for the treatment of rheumatism/arthritis.

**Keywords** antioxidant; antioproliferative; catigua-branco; inflammation.

**Corresponding Author** Anelise Formagio

**Corresponding Author's Institution** UFGD

**Order of Authors** Jacenir dos Santos, Kamila do Nascimento, Pedro de Oliveira, Rafael de Souza, Candida Kassuya, Claudia Cardoso, Maria do Carmo Vieira, Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz, Mary Ann Foglio, Anelise Formagio, João Ernesto de Carvalho

**Suggested reviewers** Garima Garg, Rúbia Oliveira, Jonas Mota

#### Submission Files Included in this PDF

##### File Name [File Type]

cover letter\_2018.doc [Cover Letter]

formagio\_manuscript.doc [Manuscript File]

To view all the submission files, including those not included in the PDF, click on the manuscript title on your EVISE Homepage, then click 'Download zip file'.

---

**To: Editor-in-Chief of Journal of Fitoterapia**

April, 2018

Dear Editor

We're submitting the manuscript: **Anti-inflammatory and antiproliferative activities of the extracts from *Trichilia silvatica* (C.DC)** The referred manuscript has not been published or is under active consideration by another journal. The manuscript was revised by AJE.

The emphasis of this work has relationship with scope of Journal, showing for the first time the evaluated anti-inflammatory and antiproliferative of the extracts of *T. silvatica*. Also evaluated the antioxidant activity, concentrations of phenolic compounds, condensed tannins, flavonoids, flavonols and HPLC/PDA analysis.

Thank you for your attention.

Sincerely yours,

Anelise Samara Nazari Formagio

Universidade Federal da Grande Dourados, UFGD

79825-070 Dourados, MS, Brasil



AMERICAN JOURNAL EXPERTS

## EDITORIAL CERTIFICATE

This document certifies that the manuscript listed below was edited for proper English language, grammar, punctuation, spelling, and overall style by one or more of the highly qualified native English speaking editors at American Journal Experts.

### Manuscript title:

Anti-inflammatory and antiproliferative potential from *Trichilia silvatica* (C.DC)

### Authors:

Jacenir Vieira da Silva, Kamilla Felipe do Nascimento, Pedro Cruz de Oliveira, Rafael Claudino de Souza, Candida Aparecida Leite Kassuya, Cláudia Andréa Lima Cardoso, Maria do Carmo Vieira, Ana Lúcia Tasca Góis Ruiz, Mary Ann Foglio, João Ernesto de Carvalho, and Anelise Samara Nazari Formagio\*

### Date Issued:

April 1, 2018

### Certificate Verification Key:

4EDA-8BA3-CCA8-667A-C0FA



This certificate may be verified at [www.aje.com/certificate](http://www.aje.com/certificate). This document certifies that the manuscript listed above was edited for proper English language, grammar, punctuation, spelling, and overall style by one or more of the highly qualified native English speaking editors at American Journal Experts. Neither the research content nor the authors' intentions were altered in any way during the editing process. Documents receiving this certification should be English-ready for publication; however, the author has the ability to accept or reject our suggestions and changes. To verify the final AJE edited version, please visit our verification page. If you have any questions or concerns about this edited document, please contact American Journal Experts at [support@aje.com](mailto:support@aje.com).

*American Journal Experts provides a range of editing, translation and manuscript services for researchers and publishers around the world. Our top-quality PhD editors are all native English speakers from America's top universities. Our editors come from nearly every research field and possess the highest qualifications to edit research manuscripts written by non-native English speakers. For more information about our company, services and partner discounts, please visit [www.aje.com](http://www.aje.com).*

Anti-inflammatory and antiproliferative activities of the extracts from *Trichilia silvatica*  
(C.DC)

Jacenir Vieira da Silva<sup>a</sup>, Kamilla Felipe do Nascimento<sup>a</sup>, Pedro Cruz de Oliveira<sup>b</sup>, Rafael Claudino de Souza<sup>a</sup>, Candida Aparecida Leite Kassuya<sup>a</sup>, Cláudia Andréa Lima Cardoso<sup>c</sup>, Maria do Carmo Vieira<sup>d</sup>, Ana Lúcia Tasca Góis Ruiz<sup>e</sup>, Mary Ann Foglio<sup>e</sup>, João Ernesto de Carvalho<sup>e</sup>, and Anelise Samara Nazari Formagio<sup>a,b\*</sup>

<sup>a</sup> Faculty of Health Science, Federal University of Grande Dourados (UFGD), Dourados, MS, Brazil

<sup>b</sup> Faculty of Biological and Environmental Sciences, Federal University of Grande Dourados (UFGD), MS, Brazil

<sup>c</sup> Chemistry course, Mato Grosso do Sul State University (UEMS) - Dourados, MS, Brazil

<sup>d</sup> Faculty of Agricultural Science, Federal University of Grande Dourados, Dourados, MS, Brazil

<sup>e</sup> Multidisciplinary Center for Chemical, Biological, and Agricultural Research, University of Campinas (Unicamp), SP, Brazil

\*Corresponding author at: [aneliseformagio@ufgd.edu.br](mailto:aneliseformagio@ufgd.edu.br) (A.S.N. Formagio)

## ABSTRACT

*Trichilia silvatica*, popularly known as “catiguá-branco”, is distributed in Brazil (Mato Grosso do Sul), and members of this genus are commonly used for the treatment of rheumatism (arthritis). The aim of this research was to investigate the anti-inflammatory, antiproliferative and antioxidant activities of the leaves (MEL-TS) and bark (MEB-TS) of *T. silvatica*. We also evaluated the concentrations of phenolic compounds, condensed tannins, flavonoids, flavonols and HPLC/PDA analysis. MEL-TS and MEB-TS were analysed by LC-PDA, and the results revealed the presence of caffeic acid in both extracts, showed high total phenolics concentrations ( $270.8 \pm 17.10$  mg GAE/ g extract and  $278.8 \pm 25.13$  mg GAE/g extract, respectively), and content of flavonoids in MEL-TS ( $209.30 \pm 2.91$  mg QE/g extract). In the antioxidant tests, MEL-TS and MEB-TL exhibited moderate scavenging activities with  $IC_{50}$  values  $\leq 35.32$   $\mu$ g/mL in lipoperoxidation. Both extracts (30-300 mg/kg) inhibited oedema induced by carrageenan at 2 h and 4 h after carrageenan induction and inhibited leukocyte migration at 6 h post administration. MEL-TS and MEB-TL (100 and 300 mg/kg) did not impact zymosan-induced arthritis. Finally, MEL-TS were particularly effective against VERO and PC-3 cell line resulting in  $GI_{50} \leq 0.22$   $\mu$ g/mL. Overall, the results indicated that the leaves and bark from *T. silvatica* exhibit anti-rheumatic potential and anti-inflammatory activity, which has contributed in part to the traditional use of this plant for the treatment of rheumatism/arthritis.

**Keywords:** antioxidant; antiproliferative; catigua-branco; inflammation.

## Introduction

*Trichilia silvatica* C. DC. (family Meliaceae, subfamily Melioideae, genus *Trichilieae*) is a perennial plant distributed in northeastern (Bahia and Alagoas), central-western (Distrito Federal, and Mato Grosso do Sul), southeastern (Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, and Rio de Janeiro) and southern (Paraná, Santa Catarina [1]. In Brazil, this plant is popularly known as “catiguá”, “catiguá-branco”, “cutia-vermelha” and “rosa-branca” [2]. Phytochemical research on the leaves this species have reported terpenes such as phytosteroids, steroids associated with pregnancy and pentacyclic triterpene, phenolics [3-7], flavonoids [6], and coumarin [3,4,8]. To the best of our knowledge, only the work reported by our research group has demonstrated the potential anti-oedematogenic and antioxidant activities of the essential oil obtained from *T. silvatica* leaves collected in Dourados-MS [9]. Surveys have identified the genus *Trichilia* as having potential insecticidal action due to its constituents such as protolimonoids and limonoids. But species of this genus have been intensely studied, and they present other pharmacological properties, including antioxidant and anti-inflammation activities [11-22].

There are no reports on the anti-inflammatory activities of the polar extracts of this species; however, members of the *Trichilia* genus are often used in South America for the treatment of rheumatism (arthritis) in addition to being used as emetic and purgative agents [23]. In the present study, we investigate the anti-inflammatory activity of the extracts (polar) of the leaves and bark from *T. silvatica* in three *in vivo* experimental models (paw oedema, pleurisy and joint). We also evaluated the antiproliferative and antioxidant activity of the extracts *in vitro* and their concentrations of phenolic compounds, flavonoids, flavonol, condensed tannins and HPLC/PDA analysis.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents



Carrageenan and dexamethasone were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Potassium persulfate, Tween 40, Folin-Ciocalteu reagent, and sodium carbonate were purchased from Dinamina (Diadema, Brazil). Sulfuric acid, methanol, ethanol, hydrochloric acid, ascorbic acid, chloroform, linolenic acid, gallic acid, aluminium chloride, sodium acetate, and vanillin were obtained from Vetec (Duque de Caxias, Brazil). 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), butylated hydroxytoluene (BHT), 2,2-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox), quercetin, catechin,  $\beta$ - carotene and *p*-coumaric acid (98%) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Spectroscopic-grade acetonitrile was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Standards (caffeic acid (98%), *p*-coumaric acid (98%), luteolin (98%), quercetin (98%) and apigenin (95%) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Other drugs and reagents used were of analytical grade.

## 2.2. *Animals*

Male and female *Swiss* mice (25–35 g, 45 days of age) were obtained from Federal University of Grande Dourados (UFGD). The animals were kept under standard laboratory conditions with a constant temperature ( $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) and a 12 h light/dark cycle with free access to food (Nuvilab<sup>®</sup>) and water. The Institutional Ethics Committee of UFGD approved the procedures and protocols adopted in the study (authorization number 07/2015).

## 2.3. *Plant material*

The leaves and bark from *T. silvatica* were collected in October 2015 in Dourados (22° 14' 16"S and 54° 48' 02"W), Mato Grosso do Sul state, Brazil, and identified by Prof. Dra. Zefa Valdevina Pereira. The voucher specimen (DDMS4662) was deposited at the herbarium of the Universidad Federal of Grande Dourados (UFGD).

#### 2.4. *Drying of the material and obtaining the methanolic extract*

The leaves (660 g) and bark (430 g) were dried under circulating air at 45 °C until a constant weight was reached. The samples were powdered and then extracted by maceration with methanol at room temperature for 10 days. The extracts were filtered, concentrated under pressure in a rotary evaporator at 50 °C, and lyophilized to obtain the methanolic extracts from the leaves (MEL-TS, 64 g) and bark (MEB-TS, 35 g).

#### 2.5. *Quantification of the phenols, flavonoids, flavonol and condensed tannins*

The content of total phenolic compounds was determined according to the Folin-Ciocalteu method using 1 mg/mL solutions of the MEL-TS or MEB-TS samples, methanol as the blank, and gallic acid as the standard [24]. The absorbance was measured at 760 nm, and the total phenolic content was expressed as gallic acid equivalents in mg per gram of extract.

To determine the flavonoids content, 2 mg/mL solutions of the samples were used. Methanol was used as the blank, a 2 mg/mL solution of quercetin was used as the standard, and the absorbance was read at 415 nm. To determine the flavonols content, 2 mg/mL solutions of the samples were used. Methanol was used as the blank, a 1 mg/mL solution of quercetin was used as the standard, and the absorbance was read at 440 nm. [25]. The concentrations are expressed as quercetin equivalents in mg per gram of extract.

To determined content of condensed tannins, was used the concentration of the sample solutions was 1 mg/mL, methanol was used as the blank, and a 1 mg/mL solution of catechin was used as the standard. The mixture was incubated in a water bath for 20 min, and then, the absorbance was measured at 510 nm [26]. The results are expressed as catechin equivalents in mg per gram of extract.

## 2.6. *LC Analysis of Standards and Samples*

The extracts obtained from the samples (MEL-TS and MEB-TS) and standards were analysed in an analytical LC (Varian 210) system equipped with a ternary solvent delivery system, an auto-sampler, and a photodiode array (PDA) detector monitored at  $\lambda = 200 - 800$  nm. The LC column was a C-18 column (25 cm x 4.6 mm; particle size, 5  $\mu\text{m}$ ; Luna, Phenomenex, Torrance, CA, USA), and a small pre-column (2.5 cm x 3 mm) containing the same packing material was used to protect the analytical column. In each analysis, the flow rate and the injected volume were 1.0 mL  $\text{min}^{-1}$  and 20  $\mu\text{L}$ , respectively. All chromatographic analyses were performed at 22°C. Elution was carried out using sodium acetate (2 mM) (solvent A) and acetonitrile (solvent B). The solvent gradient program was as follows: initially 10 % B; 10 min, 15% B; 5 min, 100% B; 15 min returning to the initial conditions.

The contents of the standard compounds in the samples were estimated by external calibration. Aliquots of the dilutions (20  $\mu\text{L}$ ) were analysed via LC, and each determination was carried out five times. For each standard, the corresponding chromatogram was obtained, and a graph was constructed from the mean of the peak areas plotted against the concentration of the standard (1-50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). A linear least square regression of the peak areas as a function of the concentration was performed to determine the correlation coefficient. The equation parameters (slope and intercept) of the standard curves were used to obtain the concentration values for the samples.

## 2.7. *Antioxidant assays*

### 2.7.1. *DPPH and ABTS free radical scavenging assay*

To evaluate the DPPH free radical scavenging activity, 2 mL of a stock solution of the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) reagent (0.1 mM) diluted in methanol was added to different concentrations of MEL-TS and MEB-TS. This mixture was incubated for 30 min at

room temperature while protected from light, and then the absorbance was measured at 515 nm [27].

For the ABTS assay, a mixture of potassium persulfate (140 mM) and ABTS reagent (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) (7.0 mM) was reacted for 16 h. Aliquots of this mixture (3 mL) were added to 30  $\mu$ L of different concentrations of MEL-TS or MEB-TS, and after 30 min, the absorbance of each mixture was measured at 734 nm [28].

The antioxidant capacities of the samples were compared with that of the reference standard, ascorbic acid. The assays were performed in triplicate.

### 2.7.2 *$\beta$ -Carotene bleaching assay*

A solution of 2 mg of  $\beta$ -carotene (in 10 mL of chloroform) was added to 20 mg of linoleic acid and 0.2 g of Tween 40®, and the chloroform was evaporated at 45°C. To this solution was added 50 mL of distilled water, and then it was stirred to form an emulsion. Aliquots of this emulsion (5 mL) were added to 0.2 mL of the samples (MEL-TS and MEB-TS) [29]. The absorbance of each mixture was read at 470 nm at time zero, and then the solutions were heated at 50°C. A new reading was taken every 15 min to monitor the oxidation until complete discoloration of the  $\beta$ -carotene was observed (105 min). The assay was performed in triplicate.

## 2.8. *Anti-inflammatory activity*

### 2.8.1 *Carrageenan-induced*

*Paw oedema:* Different groups of male mice (n = 6 animals/group) were orally administered MEL-TS and MEB-TS (30, 100 and 300 mg/kg) or vehicle. Another group of mice were treated subcutaneously with the anti-inflammatory drug dexamethasone (0.5 mg/kg). After 1 h, the animals received a 50  $\mu$ L sc. injection of carrageenan (300  $\mu$ g/paw)

suspended in sterile 0.9% saline into the right hind paw. The contralateral paw received only saline and was used as the control. The thickness of the paw oedema was measured using a plethysmometer (Digital LE 7500, Panlab Harvard-Apparatus) 1 h before any treatment and at different time points (0.5, 1, 2 and 4) after the injection of carrageenan. The results were expressed in  $\mu\text{m}$ , and the difference between the basal and post-injection values was quantified as the oedema [30].

*Pleurisy:* We subjected female mice ( $n = 6$  animals/group) to oral treatment with MEL-TS and MEB-TS at doses of 100 and 300 mg/kg or vehicle (0.9% saline or naive and control group). The positive control group received a dose of 0.5 mg/kg dexamethasone subcutaneously. The experimental pleurisy was induced in the treatment groups by intrapleural injection of 100  $\mu\text{L}$  of 1% carrageenan diluted in saline as described above. The naive group received 100  $\mu\text{L}$  of sterile saline by intrapleural injection. After 4 h, the animals were sacrificed, and the pleural cavity was analysed. It was rinsed with 1 mL of phosphate buffer saline (PBS). A 20  $\mu\text{L}$  aliquot of the washing liquid (exudate) was collected from the pleural cavity, and Turck reagent was diluted (1:20) and used to determine the total leukocyte counts in a Neubauer chamber under a microscope (Olympus CX 40RF100- Japan) [31,32].

#### 2.8.2. Zymosan induced Joint

MEL-TS and MEB-TS (100 and 300 mg/kg) and DEX (0.5 mg/kg) or vehicle were orally administered to male mice. Joint inflammation was induced by intra-articular (i.art.) injection of zymosan (500  $\mu\text{g}$  per cavity in 25  $\mu\text{L}$  of sterile saline) [33,34].

#### 2.9. Antiproliferative activity

*In vitro* antiproliferative activity was assessed by the sulforhodamine B method [35]. Human cell lines melanoma (UAC62), breast (MCF-7), resistant ovary (NCI/ADR), lung (NCI- H460), ovarian (OVCAR-3), colon (HT-29), leukemia (K-562), glioma (U251),

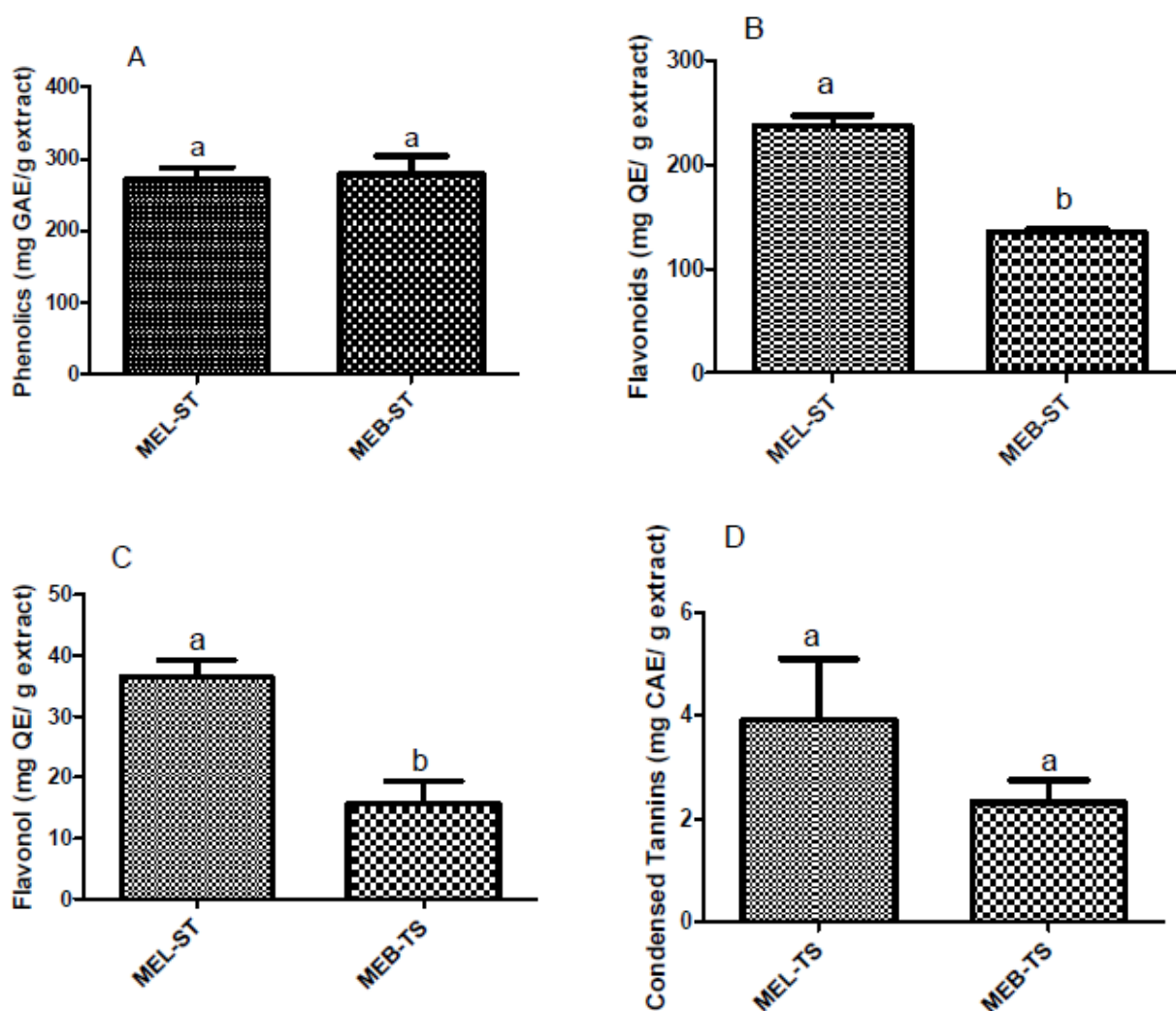
prostate (PC-3), renal (786-0) and normal epithelial renal cell line, green monkey, (VERO) were added to a 96-well plate (100  $\mu$ l of cells/well) and then exposed to different concentrations of MEL-TS and MEB-TS in DMSO (0.25 to 250  $\mu$ g/mL) at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> for 48 h. The drug doxorubicin (0.025 to 25  $\mu$ g/mL) was used as a positive control. Cell proliferation was determined using the equation  $100 \times (T - T_0) / C - T_0$ . A cytostatic effect was observed when  $T \geq T_0$ , and a cytotoxic effect occurred when  $T < T_0$ . The assays were performed in triplicate.

### 2.10. Statistical analysis

All data are presented as the mean  $\pm$  S.E.M. Differences between groups were evaluated by analysis of variance (one-way ANOVA) followed by Student-Newman-Keuls test. The number of animals per group is indicated in the figure legends. Statistical differences were considered to be significant at  $P < 0.05$ .

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

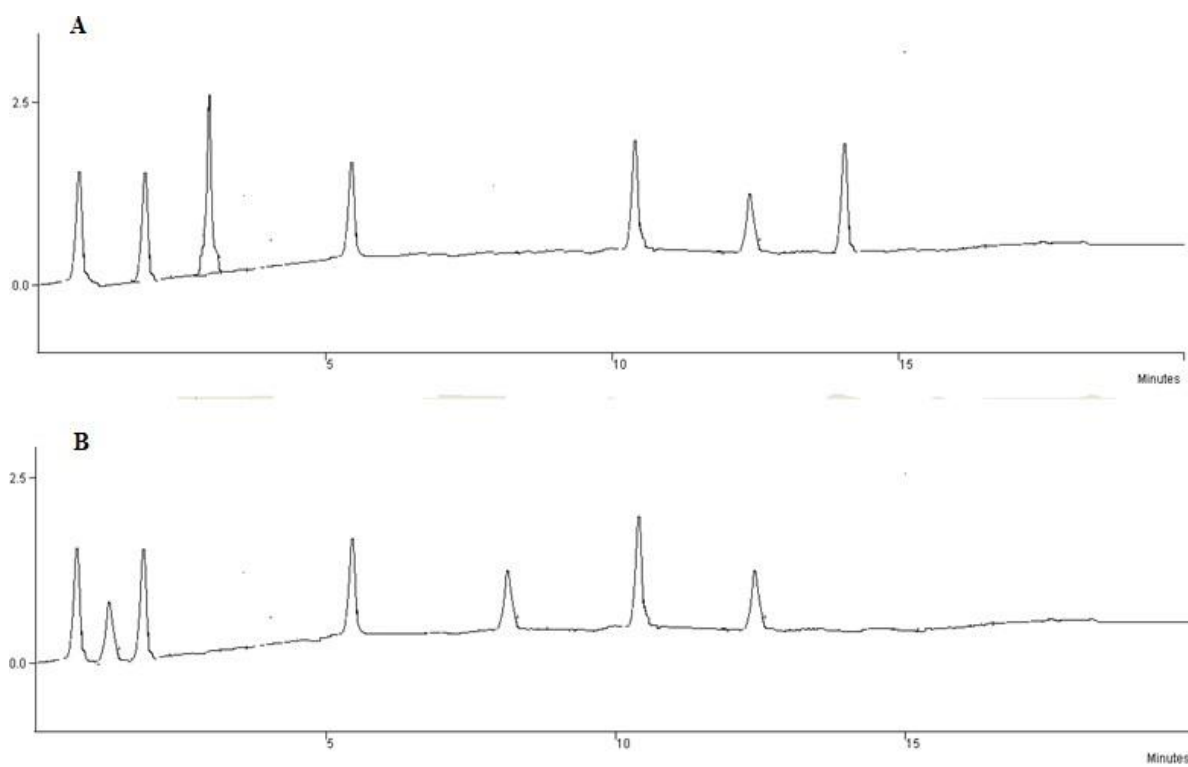
The air-dried and powdered leaves and bark of *T. silvatica* collected in Dourados-MS were separately extracted by maceration at room temperature, and subsequent filtration and evaporation of the resulting solutions under reduced pressure provided a dark-greenish leaf extract (MEL-TS) and a brown bark extract (MEB-TS). The analysis of the extracts showed variations in the contents of phenolic and/or polyphenolic compounds, highlighting the total phenolics concentration in MEL-TS ( $270.8 \pm 17.10$  mg GAE/ g extract), MEB-TS ( $278.8 \pm 25.13$  mg GAE/g extract (Fig. 1A) and flavonoids by MEL-TS ( $209.30 \pm 2.91$  mg/QE/g extract) (Fig. 1B). Both extracts showed lower contents of flavonol and condensed tannins than phenols and flavonoids (Fig. 1C, D).



**Fig. 1.** Contents of the constituents of the methanolic extracts from *T. silvatica* leaves (MEL-TS) and bark (MEB-TS). For the determination of (A) total phenols, a standard curve of gallic acid ( $Y = -0.052 + 7.5x$ ;  $R = 0.99727$ ) was used; for flavonoids and flavonols (B) and (C), a standard curve of quercetin ( $Y = 0.3546 + 12.8030X$ ;  $R = 0.99972$ ) was used; and for condensed tannins (D), a standard curve of catechin ( $Y = 0.00896 + 0.84392X$ ;  $R = 0.98978$ ) was used.

After determining the concentrations of the constituents, both the extracts from *T. silvatica* and the standards were analysed by analytical LC (Fig. 2). Identification of the

compounds with a PDA detector scanning in the spectral range of 200-800 nm did not reveal interferences at the retention times of the samples in the LC chromatogram obtained using the developed elution method. Standards were easily identified and quantified based on their absorption spectra in the UV region and their retention time. Standards present in the extracts were unambiguously identified by performing co-injection experiments in which aliquots of the extracts and standards were mixed diluted to a known volume, and analysed by LC. The calibration curves were determined by linear regression using LC. The linearity each standard was assessed for five concentrations. The average standard errors for the peak areas of replicated injections ( $n = 5$ ) were less than 1%, which shows good repeatability of the calibration curve. The respective coefficients of determination ( $r^2$ ) were 0.9994 for caffeic acid and p-coumaric acid and 0.992 ferulic acid and sinapic acid. Only caffeic acid ( $t_r = 1.76$  min) was present in both MEL-TS (93  $\mu\text{g/g}$ ) and MEB-TS (102  $\mu\text{g/g}$ ) (Fig. 2A, B). Sinapic acid ( $t_r = 3.80$  min) was found in MEL-TS (198  $\mu\text{g/g}$ ) (Fig. 2A).



**Fig. 2.** Chromatograms of MEL-TS (A) and MEB-TS (B) extracts by HPLC/PDA analysis.



The presence of phenolic compounds in both the extracts from *T. silvatica* prompted us to investigate the antioxidant activity of this extracts and the phenolic compounds present in the extracts by three different assays (DPPH, ABTS and  $\beta$ -carotene/linoleic acid), as shown in Table 1. In the  $\beta$ -carotene assay, the extracts (MEL-TS and MEB-TS) exhibited moderate activities with  $IC_{50}$  values of 35.32  $\mu$ g/mL and 26.32  $\mu$ g/mL, respectively (Table 1), which are comparable to that of the standard antioxidant, ascorbic acid ( $IC_{50} = 4.13$   $\mu$ g/mL). In the DPPH assay, MEB-TL ( $IC_{50} = 42.4$   $\mu$ g/ml), was the most active. The potencies of the extracts of the leaves and barks were correlated with the total content of phenolic compounds (caffeic acid and sinapic acid) found in the *Trichilia* that can inhibit the peroxidation of lipids [36,37]. The phenolic compounds found in samples by LC-DAD showed potent free-radical scavenging activity, and caffeic acid was particularly potent ( $IC_{50} = 8.10$   $\mu$ g/mL).

**Table 1:** Antioxidant activity of *T. silvatica* leaf and bark extracts, and compounds showed in samples, by DPPH, ABTS and  $\beta$ -carotene/linoleic acid assays.

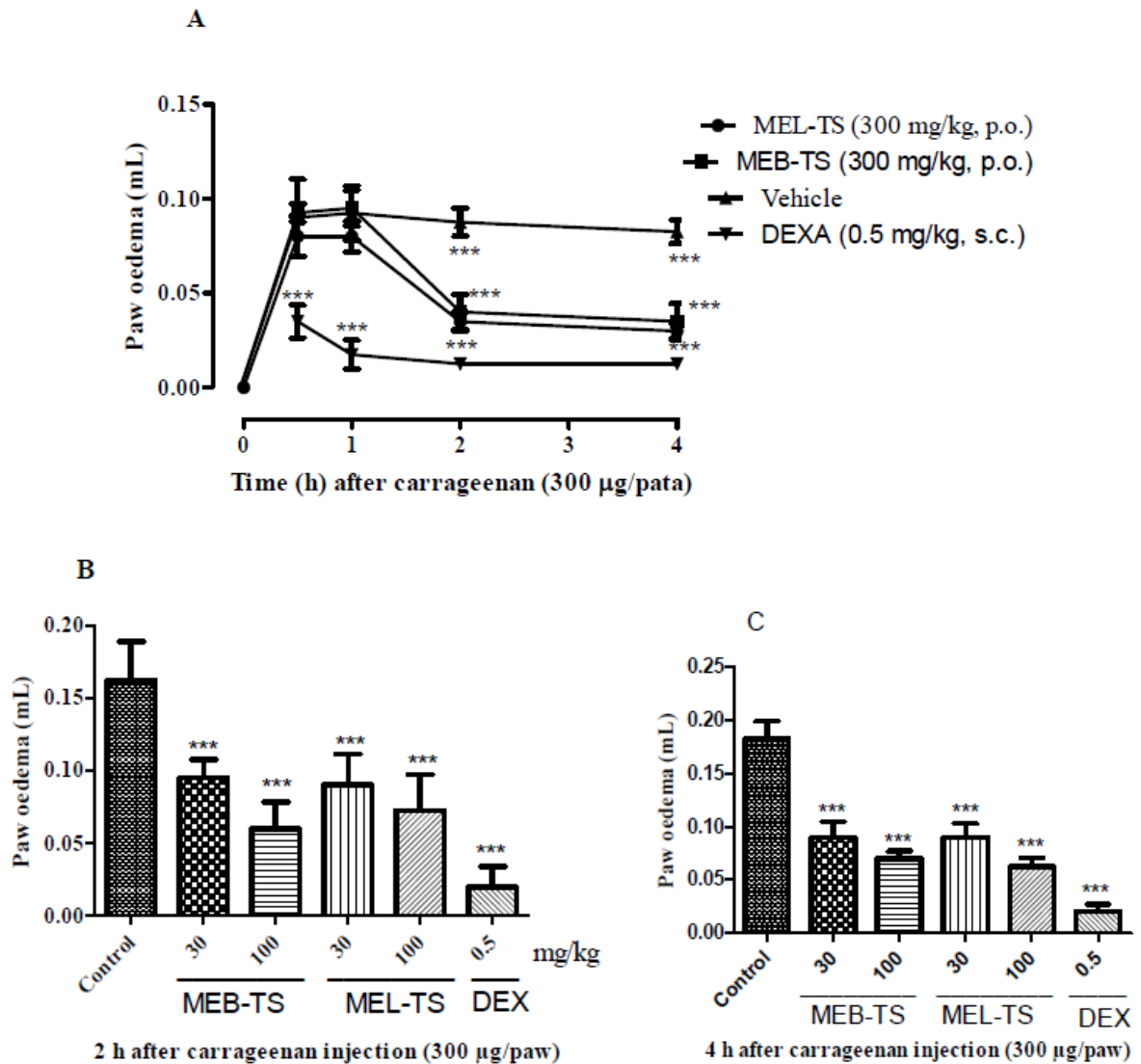
Samples	DPPH	ABTS	$\beta$ -caroteno/ linoleic acid
$IC_{50}$ ( $\mu$ g/mL)			
MEL-TS	79.9 $\pm$ 4.32	82.99 $\pm$ 7.32	35.32 $\pm$ 17.84
MEB-TS	42.4 $\pm$ 5.44	76.19 $\pm$ 10.44	26.32 $\pm$ 13.45
caffeic acid	8.10 $\pm$ 18.32	24.13 $\pm$ 6.78	16.32 $\pm$ 2.45
sinapic acid	16.24 $\pm$ 2.12	28.77 $\pm$ 7.06	27.44 $\pm$ 1.78
Ascorbic acid	22.28 $\pm$ 3.53	16.40 $\pm$ 5.28	4.13 $\pm$ 1.42

Antioxidants are able to intercept free radicals generated by cellular metabolism or by exogenous sources, which prevents them from attacking lipids, the amino acids of proteins, the double bonds of the polyunsaturated fatty acids and DNA bases, which in turn prevents the formation of lesions and loss of cell integrity. The formation of free radicals *in vivo* occurs

via the catalytic action of enzymes, during the electron transfer processes in cell metabolism and by exposure to exogenous pressures, *i.e.*, exogenous inflammation factor gamma and ultraviolet radiation.

In an attempt to justify the common use of this genus, in conjunction with the strong antioxidant activities found for *T. silvatica*, we determined through the Cg-induced paw oedema and pleurisy model that this plant can serve as an inflammatory agent as it reduces inflammation caused by the release of prostaglandins, which cause the formation of oedema and increase the volume of the exudate in the pleural cavity and leukocyte migration [38,39], and zymosan-induced joint inflammation. In the paw oedema assay, the oral treatment with both extracts, MEL-TS ( $54.20 \pm 5\%$ ;  $57.50 \pm 7\%$ ) and MEB-TS ( $60.00 \pm 3\%$ ;  $63.63 \pm 5\%$ ), at a dose of 300 mg/kg significantly inhibited oedema formation at 2 and 4 h, respectively, after its administration as indicated by the time course analysis (Fig. 3A). In low doses, MEL-TS (30 and 100 mg/kg) and MEB-TS (30 and 100 mg/kg), significantly inhibited oedema formation at 2 h post administration ( $44.61 \pm 3\%$ ,  $53.85 \pm 5\%$ ,  $41.54 \pm 7\%$  and  $63.07 \pm 3\%$ , respectively, Fig. 3B) and 4 h post administration (Fig. 3C) with inhibitions of  $50.68 \pm 4\%$ ,  $67.75 \pm 3\%$ ,  $50.68 \pm 8\%$  and  $61.64 \pm 5\%$ , respectively.

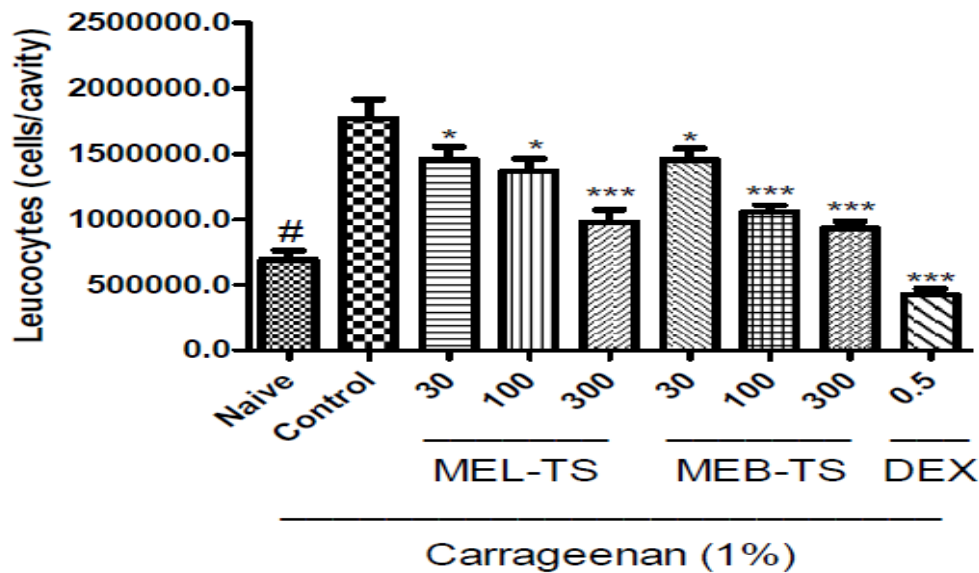
Carrageenan induces high-protein exudates containing large amounts of a number of neutrophils [37] and it presents three distinct phases involved in the acute inflator response. The first phase relates to the release of histamine and serotonin, the second phase involves the release of bradykinin, while prostaglandins are involved in the last phase [39]. The both samples from *T. silvatica* were able to reduce foot oedema in all phases of the inflammatory response at the above dose, suggesting an unspecific effect.



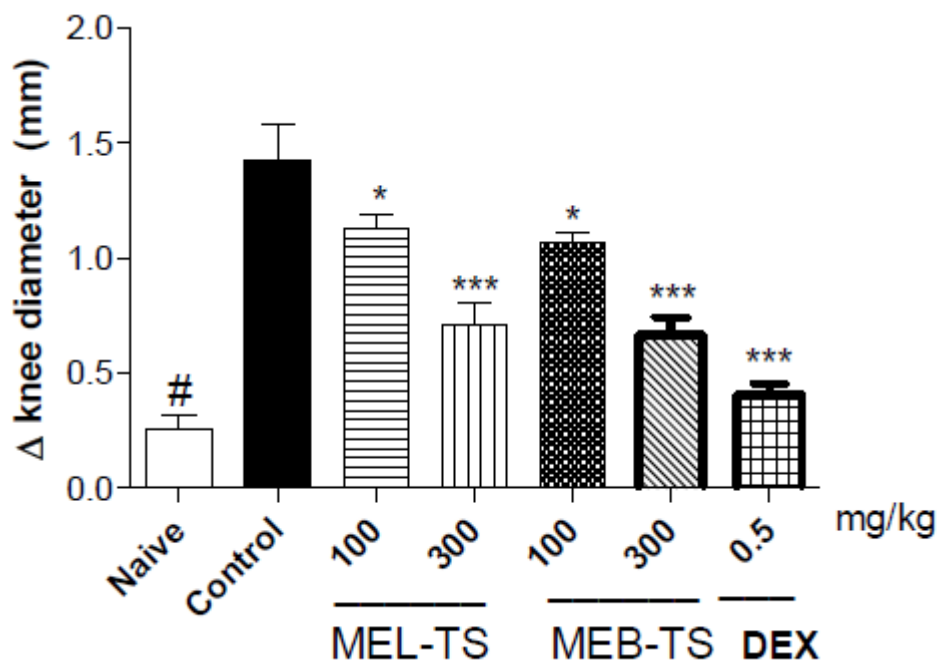
**Fig. 3.** Effects of the methanolic extract of the (MEL-TS) leaves and (MEB-TS) bark from *T. silvatica* on oedema formation induced by carrageenan in mice. Animals received MEL-TS (30, 100 or 300 mg/kg), MEB-TS (30, 100 or 300 mg/kg) by oral administration. The bars represent the mean  $\pm$  SEM of 6 animals. The results are expressed (mL) as a comparison between the control group and the treated group. \*\*\* $P < 0.0001$ , one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test.

The administration of carrageenan to the pleural cavity of the animals induced an increase in total leukocyte content (Fig. 4), 4 h after injection, verifying that oral

administration of MEL-TS (300 mg/kg) and MEB-TS (100 and 300 mg/kg) significantly reduce the magnitude of the increase in total leukocytes (inhibition of  $44.70 \pm 6\%$ ,  $40.20 \pm 4\%$ , and  $40.20 \pm 2\%$ , respectively) (Fig. 4). When MEL-TS was administered at a dose of 30 and 100 mg/kg and MEB-TS at a dose of 30 mg/kg, inhibitions of  $17.60 \pm 8\%$ ,  $22.6 \pm 8\%$ , and  $17.89 \pm 9\%$ , respectively, were observed, which demonstrated that the effect was not dose dependent. DEX (positive control) reduced the magnitude of the increase in total leukocytes by  $75.9 \pm 2\%$ .



**Fig. 4.** Effects of MEL-TS and MEB-TS on total leukocytes induced by carrageenan in the pleural cavity of mice. Animals received MEL-TS (30, 100 or 300 mg/kg), MEB-TS (30, 100 or 300 mg/kg), DEX (0.5 mg/kg; s.c.) by oral administration, and the naive and control groups received only the vehicles. After 1 h, the animals received an intrapleural injection of Cg or saline solution (100  $\mu$ L of a 1% solution/cavity). The bars represent the mean  $\pm$  SEM of 6 animals. The # symbol indicates significant differences between the naive and control group ( $P < 0.001$ ), while the \* symbol compares the treated group to the control group: \*\*\*  $P < 0.001$ , \*  $P < 0.05$ , one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test.

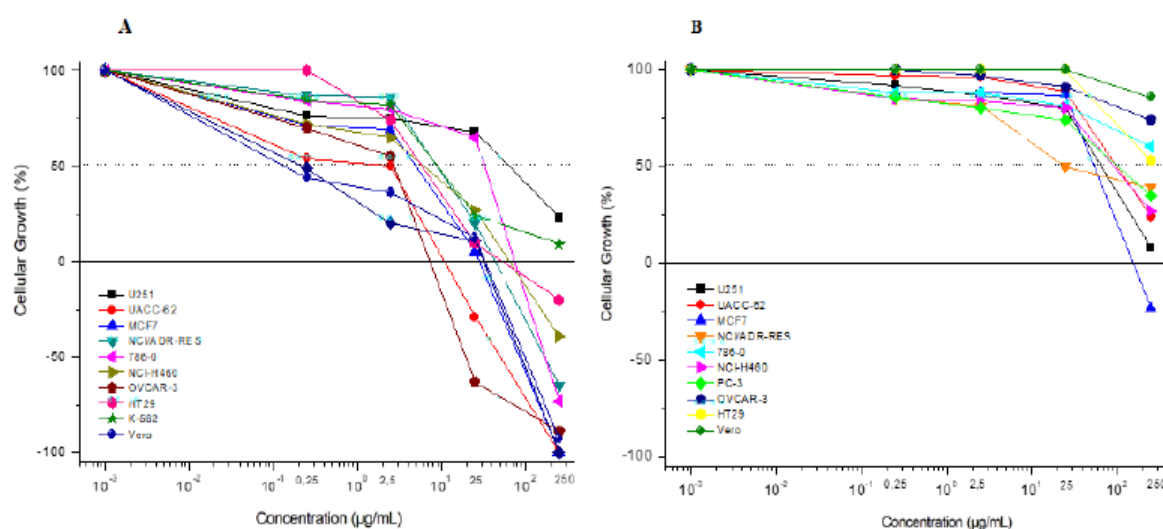


**Fig. 5.** Effect of MEL and MEB from *T. silvatica* on zymosan-induced joint inflammation.

In a second assay against arthritis (zymosan-induced joint inflammation), a dose of 300 mg/kg of MEL-TS ( $50.00 \pm 9\%$ ) and MEB-TS ( $53.30 \pm 6\%$ ) significantly inhibited this inflammation (Fig. 5) compared to a dose of 100 mg/kg of the MEL-TS ( $20.56 \pm 10\%$ ) and MEB-TS ( $25.34 \pm 8\%$ ) and compared to the control group. The DEX (0.5 mg/kg) showed inhibited 71.59% (Fig. 5).

In addition, the antiproliferative properties of the samples from *T. silvatica* were assessed against eleven cancer cell lines. The MEL-TS extract was the most active and showed  $GI_{50}$  values (which refers to the drug concentrations that resulted in a 50% reduction in cellular growth) less than 10  $\mu\text{g/mL}$  and TGI (cytostatic activity) less than 63.00  $\mu\text{g/mL}$ , and a  $LC_{50} \leq 80.00$  (cytotoxic activity) against nine of the tested tumour cell lines. These results highlight its efficacy for the growth inhibition of specific cell lines, including VERO ( $GI_{50} = 0.11 \mu\text{g/mL}$ ; TGI = 32.4  $\mu\text{g/mL}$ ), PC-3 ( $GI_{50} = 0.22 \mu\text{g/mL}$ ; TGI = 27.7  $\mu\text{g/mL}$ ,  $LC_{50} = 79.90 \mu\text{g/mL}$ ), UAC62 ( $GI_{50} = 2.44 \mu\text{g/mL}$ ; TGI = 10.7  $\mu\text{g/mL}$ ;  $LC_{50} = 38.84 \mu\text{g/mL}$ ), OVCAR-3 ( $GI_{50} = 2.61 \mu\text{g/mL}$ ; TGI = 7.57  $\mu\text{g/mL}$ ;  $LC_{50} = 17.96 \mu\text{g/mL}$ ), MCF-7 ( $GI_{50} =$

4.76  $\mu\text{g/mL}$ ; TGI = 27.9  $\mu\text{g/mL}$ ; LC<sub>50</sub> = 79.57  $\mu\text{g/mL}$ ), HT29 (GI<sub>50</sub> = 5.68  $\mu\text{g/mL}$ ; TGI = 49.5  $\mu\text{g/mL}$ ), NCI-H460 (GI<sub>50</sub> = 6.09  $\mu\text{g/mL}$ ; TGI = 63.00  $\mu\text{g/mL}$ ), NCI-ADR (GI<sub>50</sub> = 8.35  $\mu\text{g/mL}$ ; TGI = 43.50  $\mu\text{g/mL}$ ) and K-562 (GI<sub>50</sub> = 8.98  $\mu\text{g/mL}$ ) cell line (Fig. 6A). The bark extract (MEB-TS) showed moderate activity against the NCI-ADR (GI<sub>50</sub> = 24.58  $\mu\text{g/mL}$ ) cell line (Fig. 6B).



**Fig. 6.** Antiproliferative activity assay of the methanolic extract of the eaves and bark from *T. silvatica*

#### 4. Conclusions

The present study demonstrates the potential anti-inflammatory effects of the methanolic extract of the leaves (MEL-TS) and bark (MEB-TS) from *T. Silvatica* by carrageenan-induced paw oedema and pleurisy and zymosan-induced joint inflammation. These results could partially support the traditional use of this plant for the treatment of rheumatism (arthritis). The preliminary results of the antiproliferative activity demonstrated that MEL-TS is particularly active against an VERO and PC-3 cell line resulting in GI<sub>50</sub>  $\leq$  0.22  $\mu\text{g/mL}$ .

## Author contributions

MCV collected the plant samples; RCS, POCJ, JVS, KFN and ASNF designed the study and conducted the phytochemical analysis including the extraction, determining the concentrations of phenolics and polyphenolics and performing antioxidant assays; CALC analysed the LC-PDA data; JVS and CALK performed the anti-inflammatory assays; and MAF, JEC and ALGTR performed the antiproliferative assays. All authors participated in the design, interpretation, and analysis of the data and approved the final manuscript.

## Conflicts of interest

No competing financial interests exist.

## Acknowledgements

The authors are grateful to FUNDECT (Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul, Brazil, 59/300.029/2015), Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil), and UFGD (Universidade Federal da Grande Dourados) for their financial support and fellowships.

## References

- [1] MV Stefano, LSB Calazans, CM Sakuragui, *Meliaceae* in Lista de Espécies da Flora do Brasil, Jardim Botânico do Rio de Janeiro (2001).
- [2] TD Pennington, BT Styles, DAH Taylor, Flora Neotropica Monograph: *Meliaceae*, New York, 28 (1981) 191-194.
- [3] AL Soares, AGL Ferreira, LR Soares, J Corsino, FR Garcez, WS Garzen, ESTUDO QUÍMICO DAS FOLHAS DE *Trichilia silvatica* (*Meliaceae*), Quim. Nova. 9 (2014) 1487-1490.

- [4] Vieira, IJC, Figueiredo, ER, E. R., Freitas, VR, Mathias, L, Braz-Filho, R, Araújo, RM: A New sesquiterpene from *Trichilia casarettii* (Meliaceae), *Am J Analyt Chem* 2 (2010) 70-72.
- [5] R Souza, VF Paula, SJ Correia, JC Nascimento, Terpenos das folhas de *Trichilia silvatica* (Meliaceae) in 32<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ) (2009).
- [6] AF Freitas, ASN Formagio, FF Pereira, JT Lucchetta, MC Vieira, Effect of extract of *Trichilia silvatica* C. DC. On development and reproduction parameters of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (*Lepidoptera*: Noctuidae), *Afr. J. Biotechnol.* 13 (2014) 2041-2049.
- [7] AJ Aladesanmi, SA Odediran, Antimicrobial activity of *Trichilia heudelotti* leaves, *Fitoterapia* 71 (2002) 179-182.
- [8] ER Figueiredo, Estudo fitoquímico e avaliação biológica dos extratos de *Trichilia casarettii* e *Trichilia silvatica* (meliaceae). Tese doutorado em produção vegetal in Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2010.
- [9] ASN Formagio, CA Kassuya, FF Neto, CRF Volobuff, EK Iriguchi, MC Vieira et al., The flavonoid content, antiproliferative, hypoglycemic, anti-inflammatory, and free radical scavenging activities of *Annona dioica* St. Hill. *BMC Complement Altern Med* 13 (2013) 14-14.
- [10] PA Matos, L Nebo, PC Vieira, JB Fernandes, MFGF Silva, RR Rodrigues, Constituintes químicos e atividade inseticida dos extratos de frutos de *Trichilia elegans* e *T. catigua* (Meliaceae). *Quim. Nova* 32 (2009) 1553-1556.
- [11] F Benencia, MC Courrèges, FC Coulombié, Anti-inflammatory activities of *Trichilia glabra* aqueous leaf extract. *J Ethnopharmacol* 71 (2000) 293-300.
- [12] TV Bonassoli, JM Chassot, R Longhini, H Milani, JCP Mello, RMW Oliveira, Subchronic administration of *Trichilia catigua* ethyl-acetate fraction promotes antidepressant-like effects and increases hippocampal cell proliferation in mice. *J Ethnopharmacol* 143 (2012) 179-184.
- [13] JM Chassot, R Longhini, L Gazarini, JCP Mello, RMW Oliveira, Preclinical evaluation of *Trichilia catigua* extracts on the central nervous system of mice. *J Ethnopharmacol* 137 (2011) 1143-114.
- [14] IMS Eldeen, FR Heerden, J Staden, Biological activities of cycloart-23-ene-3,25-diol isolated from the leaves of *Trichilia dregeana*. *S Afr J Mar Sci* 73 (2007) 366-371.
- [15] IMS Eldeen, EE Elgorashi, J Staden, Antibacterial, anti-inflammatory, anti-cholinesterase and mutagenic effects of extracts obtained from some trees used in South



African traditional medicine, *J Ethnopharmacol* 102 (2005) 457–464.

[16] SF Espada, LC Faccin-Galhardi, VP Rincao, AL Bernardi, N Lopes, R Longuini et al., Antiviral activity of *Trichilia catigua* bark extracts for herpesvirus and poliovirus. *Curr Pharm Biotechnol* 16 (2015) 724-732.

[17] MP Germanò, V D'angelo, R Sanogo, S Catania, R Alma, R De Pasquale et al., Hepatoprotective and antibacterial effects of extracts from *Trichilia emetica* Vahl. (Meliaceae). *J Ethnopharmacol* 96 (2005) 227-232.

[18] MP Germanò, V D'Angelo, T Biasini, R Sanogo, R De Pasquale, S Catania, Evaluation of the antioxidant properties and bioavailability of free and bound phenolic acids from *Trichilia emetica* Vahl. *J Ethnopharmacol* 105 (2006) 368-373.

[19] PJ Kandem, ST Stefanello, AA Bolignon, C Wagner, IJ Kade, RP Pereira, In vitro antioxidant activity of stem bark of *Trichilia catigua* Adr. Juss. *Acta Pharm* 62 (2012) 371-382.

[20] G Garima, *Trichilia connaroides* Wight and Arnott: Ethnobotany, Phytochemistry and Pharmacology. *Chin J Nat Med* 9 (2011) 241-248.

[21] YS Xie, MB Isman, P Gunning, S Mackinnon, JT Arnason, DR Taylor, et al., Biological Activity of Extracts of *Trichilia* Species and the Limonoid Hirtin Against Lepidopteran Larvae. *Biochem. Syst. Ecol.* 22 (1994) 129-136.

[22] AH Chen, Q Wen, YL Ma, ZH Jiang, QL Liu, JY Tang, Bioactive mexicanolide-type limonoids from the fruits of *Trichilia connaroides*. *Phytochem Lett* 20 (2017) 17-21.

[23] MP Corrêa, *Dicionário de plantas úteis do Brasil e das Exóticas cultivadas*. Ministério da Agricultura, Imprensa Nacional 1996.

[24] A Djeridane, M Yousfi, B Nadjemi, D Boutassouna, P Stocker, N Vidal, Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem* 97 (2006) 654-660.

[25] JY Lin, CY Tang, Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. *Food Chem* 101 (2007) 140–147.

[26] RB Broadhurst, WT Jones, Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. *J. Sci. Food Agric* 29 (1978) 788-794.

[27] MS Blois, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181 (1958) 1199–1200.

[28] MSM Rufino, RE Alves, ES Brito, SM Morais, CG Sampaio, J Pérez-Jimenez, et al., Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela

Captura do Radical Livre ABTS + Comunicado Técnico 128. Embrapa (2007).

[29] GH Jayaprakasha, RP Singh, KK Sakariah, Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. Food Chem 73 (2001) 285-290.

[30] CA Kassuya, DF Leite, LV de Melo, VL Rehder, JB Calixto, Anti-inflammatory properties of extracts, fractions and lignans isolated from *Phyllanthus amarus*. Planta Med 71 (2005) 721-726.

[31] CA Kassuya, A Cremonese, LF Barros, AS Simas, FR Lapa, R Mello-Silva, et al., Antipyretic and anti-inflammatory properties of the ethanolic extract, dichloromethane fraction and costunolide from *Magnolia ovata* (Magnoliaceae). J Ethnopharmacol 124 (2009) 369-376.

[31] JA Santos, A Arruda, MA Silva, CA Cardoso, MC Vieira, CA Kassuya, et al., Anti-inflammatory effects and acute toxicity of hydroethanolic extract of *Jacaranda decurrens* roots in adult male rats. J Ethnopharmacol 144 (2012) 802-807.

[31] C Penido, FP Conte, MS Chagas, CA Rodrigues, JF Pereira, MG Henriques, Antiinflammatory effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on zymosan-induced arthritis in mice. Inflamm Res 11 (2006) 457-464.

[32] FP Conte, C Barja-Fidalgo, WAJ Verri, FQ Cunha, GA Rae, C Penido, et al., Endothelins modulate inflammatory reaction in zymosan-induced arthritis: participation of LTB<sub>4</sub>, TNF- $\alpha$ , and CXCL-1. J Leukoc Biol, 84 (2008) 652-660.

[33] Monks, A, Scudiero, D, Skehan, P, R Shoemaker, K Paull, D Vistica, et al.: Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. J. Nat. Cancer Inst 83 (1991) 757-766.

[34] PE Hartman, DM Shankel: Antimutagens and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molecules. Environ Mol Mutagen 15 (1990) 145-182.

[35] B Halliwell, R Aeschbach, J Lölinger, OI Aruoma, The characterization on antioxidants. Food Chem Toxicol 33 (1995) 601-617.

[36] FA Santos, VSN Rao, Study of the anti-pyretic effect of quinine, an alkaloid effective against cerebral malaria, on fever induced by bacterial endotoxin and yeast in rats. J Pharm Pharmacol 50 (1998) 225-229.

[37] M Di Rosa, JP Giroud, DA Willoughby, Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. J Pathol 104 (1971) 15-29.

[38] TN Lo, AP Almeida, MA Beaven, Dextran and carrageenan evoke different inflammatory response in rat with respect to composition of infiltrates and effect of indomethacin. *J Pharmacol Exp Ther* 221 (1982) 261-267.

## 7. CONCLUSÕES

Neste estudo do extrato metanólico bruto obtido da casca e folhas de *T. silvatica* verificou-se a presença majoritária de fenóis e flavonóides nas cascas e folhas de *T. silvatica* e presença de ácido caféico nas folhas e cascas e ácido sináptico nas cascas. Demonstrou atividade significativa aos ensaios propostos em comparação ao BHT, ácido ascórbico e quercetina, apresentou ação anti-inflamatória significativa por inibir a migração de leucócitos, artrite induzida por symozan e edema de pata. Atividade antiproliferativa demonstrou que o extrato obtido das folhas foi ativo contra células VERO (célula epitelial de rim de macaco verde) e PC-3 (próstata). Além disso, estudos mais detalhados sobre a composição química destes extratos, bem como estudos com outros modelos e ensaios *in vivo* são essenciais para caracterizar e elucidar suas ações biológicas.

## 8. ANEXO

## ANEXO 1- CARTA DE APROVAÇÃO DO CEUA- COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

### COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Dourados-MS, 17 de novembro de 2015.

#### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Estudo fitoquímico e avaliação da atividade farmacológica de *Trichilia Sylvatica*", protocolo nº 07/2015, sob responsabilidade de Anelise Samara Nazari Formagio – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFGRD) da Universidade Federal da Grande Dourados, em reunião de 02 de outubro de 2015.

<i>Vigência do Projeto</i>	20/11/2015 – 20/02/2016
<i>Espécie/linhagem</i>	<i>Mus musculus</i> / Swiss <i>Rattus norvegicus</i> / Wistar
<i>Nº de animais</i>	40 <i>Mus musculus</i> / Swiss 30 <i>Rattus norvegicus</i> / Wistar
<i>Peso/idade</i>	<i>Mus sp.</i> 25-30g / 45 dias <i>Rattus sp</i> 200-300g / 60 dias
<i>Sexo</i>	Machos e Fêmeas
<i>Origem</i>	Camundongos Swiss e Ratos Wistar – Biotério da Faculdade Ciências da Saúde/FCS-UFGRD

*Melissa Negrão Sepulveda*

Melissa Negrão Sepulveda  
Coordenadora CEUA