

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA  
GERAL/BIOPROSPECÇÃO**

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTI-INFLAMATORIA E ANTI-HIPERALGESICA  
DO EXTRATO METANÓLICO E DO ALCALOIDE INDÓLICO MONOTERPÊNICO  
DE *Palicourea crocea* (SW.) SCHULT.**

**PEDRO CRUZ DE OLIVEIRA JUNIOR**

**DOURADOS  
2018**

**PEDRO CRUZ DE OLIVEIRA JUNIOR**

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTI-INFLAMATORIA E ANTI-HIPERALGESICA  
DO EXTRATO METANÓLICO E DO ALCALOIDE INDÓLICO MONOTERPÊNICO  
DE *Palicourea crocea* (SW.) SCHULT.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências da Biológicas e Ambientais – FCBA da Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD- para obtenção do Título de Mestre em Biologia Geral, Área de Concentração: Bioprospecção.

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

**DOURADOS  
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

J99a Júnior, Pedro Cruz De Oliveira

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTI-INFLAMATORIA E ANTI-HIPERALGESICA DO EXTRATO METANÓLICO E DO ALCALOIDE INDÓLICO MONOTERPÊNICO DE *Palicourea crocea* (SW.) SCHULT. [recurso eletrônico] / Pedro Cruz De Oliveira Júnior. -- 2022.

Arquivo em formato pdf.

Orientadora: Anelise Samara Nazari Formagio.

Dissertação (Mestrado em Biologia Geral/Bioprospecção)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2018.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:

<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Antioxidante. 2. Anti-hiperalgesica. 3. Croceaína A. 4. Douradinha. 5. Oedema. I. Formagio, Anelise Samara Nazari. II. Título.

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

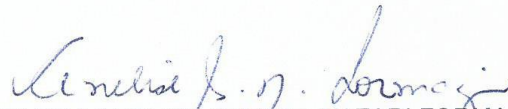
©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

“ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTI-HIPERALGÉSICA DO  
EXTRATO METANÓLICO E DO ALCALOIDE INDÓLICO MONOTERPÊNICO DE  
*Palicourea crocea* (SW.) SCHULT”

POR

**PEDRO CRUZ DE OLIVEIRA JUNIOR**

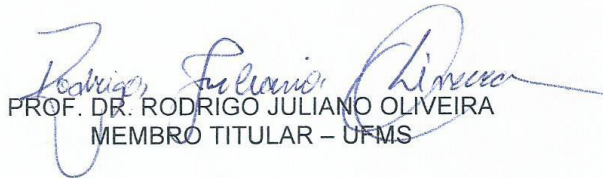
DISSERTAÇÃO APRESENTADA À UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE  
DOURADOS (UFGD), COMO PARTE DOS REQUISITOS EXIGIDOS PARA  
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM BIOLOGIA GERAL - ÁREA DE  
CONCENTRAÇÃO: “BIOPROSPECÇÃO”.



PROF.<sup>a</sup> DR.<sup>a</sup> ANELISE SAMARA NAZARI FORMAGIO  
ORIENTADORA – UFGD



PROF.<sup>a</sup> DR.<sup>a</sup> CLAUDIA ANDREA LIMA CARDOSO  
MEMBRO TITULAR – UEMS



PROF. DR. RODRIGO JULIANO OLIVEIRA  
MEMBRO TITULAR – UFMS

Aprovado em 26 de abril de 2018.

“Se não puder voar,  
corra. Se não puder correr,  
ande. Se não puder andar,  
rasteje, mas continue em  
frente

SEMPRE”.  
**Martin Luther king**

Dedico este trabalho aqueles que me deram apoio incondicional durante esta caminhada de aprendizado e vivência.

Especialmente aos meus pais, Pedro e Safira e ao meu professor que me motivou a ingressar nessa jornada Jelly Makoto Nakagaki.

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus por ter iluminado meu caminho e abençoado minhas escolhas. Sem a presença divina nos dias difíceis não teria eu suportado com tal serenidade as dificuldades encontradas durante a caminhada.

À minha orientadora, prof<sup>a</sup> Dra. Anelise Samara Nazari Formagio pela oportunidade de trabalho, excepcional orientação e incansável dedicação, amizade, paciência, conselhos, auxílios e por ter acreditado no meu potencial.

Aos meus amigos do laboratório e mestrado e doutorado Diego, Rafael, Milena, Carla, Kamila, Camila, Juliane e Sidney pelos bons momentos vividos, pela amizade oferecida e por tornar nossos experimentos possíveis.

A Doutora Joyce Alencar do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, por ser sempre tão prestativa.

Aos amigos fora do laboratório que sempre estiveram comigo em todos os momentos independente das dificuldades sempre prestando seu apoio, amor e pelos bons momentos vividos, e por ser a minha segunda família durante esses sete anos de Dourados.

A minha família pelo amor incondicional e apoio sempre. Sem vocês essa conquista não seria possível.

A CAPES ao apoio financeiro.

## SUMÁRIO

Resumo	V
Abstract	VI
Lista de figuras	VII
Lista de abreviaturas	VIII
1 Introdução	1
2 Revisão Bibliográfica	2
2.1 <i>Palicourea</i>	2
2.2 <i>Palicourea crocea</i> (Sw.) Schult.	6
2.3 Estresse oxidativo	9
2.4 Antioxidantes	9
2.5 Flavonoides	10
2.6 Inflamação	10
2.7 Processo inflamatório	10
3 Objetivo Geral	12
3.1 Objetivo específico	12
4 Manuscrito	12
5 Referencias	30
6 Anexos	38
6.1 Aprovação final comitê de ética de uso animal	38



## RESUMO

**Objetivos:** *Palicourea crocea* mostrou resultados promissores em investigações químicas, que incluem o isolamento de alcaloides entretanto, nenhuma análise biológica foi conduzida até o momento para avaliar as propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antinociceptivas. **Métodos:** A composição química do extrato metanólico de folhas de *P. crocea* (EMPC) foi investigada pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC/DAD) e as concentrações de compostos fenólicos totais, flavonoides, flavonols e taninos condensados também foram determinadas assim como o isolamento do principal alcaloide (PC-1) desta planta. A atividade antioxidante do EMPC e PC-1 foi avaliada quanto à atividade sequestradora de radicais livres utilizando o DPPH e o ABTS e peroxidação lipídica usando malondialdeído (MDA). EMPC (300, 100 e 50 mg / kg) e PC-1 (50 e 10 mg / kg) também foram testados sua atividade anti-inflamatórias em edema de pata de camundongos induzidos por carragenina, anti-hiperalgésico para sensibilidade ao frio e hiperalgisia mecânica. **Resultados:** EMPC apresentou maiores concentrações de compostos fenólicos e flavonóides ( $\leq 800,35$  mg / g) e revelados por análise de HPLC-DAD o ácido cafeico, ácido ferúlico, rutina e quercetina. O EMPC apresentou potente atividade antioxidante para o radical ABTS ( $IC_{50} = 68,5$   $\mu$ g / mL) e MDA (74%). A administração oral do EMPC (300, 100 e 50 mg / kg) e do alcalóide croceína-A (PC-1) (50 e 10 mg / kg) apresentou efeito anti-edematogênico no edema de pata induzido por Cg em 2 e 4h. Também reduziu significativamente a hiperalgisia mecânica e a resposta ao frio à acetona em camundongos em 3 e 4 horas após a injeção. **Conclusões:** Pela primeira vez, avaliamos as atividades antioxidante, anti-inflamatória e anti-hiperalgésica de *P. Crocea*.

**Palavras-chave:** Antioxidante; Anti-hiperalgesica; Croceína A; Douradinha; Oedema.

## **ABSTRACT**

**Objectives:** *Palicourea crocea* showed promising results in chemical investigations, which include the isolation of alkaloids; however, no biological analyses have been conducted so far to evaluate the antioxidant, anti-inflammatory and antinociceptive properties. **Methods:** The chemical composition of the methanolic extract from *P. crocea* leaves (MEPC) were investigated using high performance liquid chromatography (HPLC/PAD) method, and the concentrations of total phenolics, flavonoids, flavonols and condensed tannins also were determined, so is the isolation the principal alkaloid (PC-1) of this plant. The antioxidant activity of the MEPC and PC-1 were evaluated for free radical scavenging activity using the DPPH and ABTS; lipid peroxidation using malondialdehyde (MDA). MEPC (300, 100 and 50 mg/kg) and PC-1 (50 and 10 mg/kg) also were tested in anti-inflammatory effects in carrageenan-induced mice paw edema and anti-hyperalgesic for cold sensitivity and mechanical hyperalgesia. **Key findings:** MEPC showed highest concentrations of phenolic and flavonoids compounds ( $\leq 800.35$  mg/g), revealed by HPLC-PDA analysis the caffeic acid, ferulic acid, rutin and quercetin. The MEPC displayed potent antioxidant activity for ABTS radical ( $IC_{50} = 68.5$   $\mu$ g/ mL) and MDA (74%). The oral administration of the MEPC (300, 100 and 50 mg/kg) and croceaine A alkaloid PC-1 (50 and 10 mg/kg) exhibited an anti-oedematogenic effect in Cg-induced paw oedema in 2 and 4h. Also reduced significantly the mechanical hyperalgesia and the cold response to acetone in mice, at 3 and 4 h after injection. **Conclusions:** For the first time, evaluating antioxidant and systemic anti-inflammatory and anti-hyperalgesic activities from *P. crocea*.

**Keywords:** antioxidant; anti-hyperalgesic; croceaine A; douradina; oedema.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Palicourea crocea</i> .	7
Figura 2. Alcaloides isolados de espécies de <i>Palicourea</i> .	7
Figura 3. Rota biosintética proposta para alcaloides indólicos monoterpenicos.	9
Figura 4. Estrutura da croceaina-A.	15
Figura 5. Cromatograma do EMPC por LC-DAD.	20
Figura 6. Efeito da administração oral do EMPC e PC-1 no edema de pata induzido por carragenina em camundongos.	23
Figura 7. Efeito da administração oral do EMPC (300, 100 ou 50 mg / kg, p.o.), PC-1 (50 ou 10 mg / kg, p.o.), na hiperalgesia mecânica em camundongos.	24
Figura 8. Efeito da administração oral do EMPC na sensibilidade ao frio induzida por acetona em camundongos.	25

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OMS	Organização Mundial da Saúde
AChE	Acetilcolinesterase
EROs	Espécies reativas de Oxigênio
ERNs	Espécies reativas de Nitrogênio
LPS	Lipopolisacarídeo
IL	Interleucinas
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral
NK	Natural killer
HPLC-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de rede de diodos
DPPH	2,2-defenil-1-picril-hidrazila
ABTS	Ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
TBARS	Espécies reativas ao ácido Tio-barbitúrico
EMPC	Extrato metanólico de <i>Palicourea crocea</i>
MEPC	Methanolic extract from <i>Palicourea crocea</i>
PC-1	Alcaloide isolado de <i>Palicourea crocea</i> croceaina-1
MDA	Malondialdeido
Cg	Carrageenan
TMS	Tetramethylsilane
PBS	Phosphate-buffered saline
BHT	Butylated hydroxytoluene
TLC	Thin layer chromatography
GAE	Gallic acid equivalent
QE	Quercetin equivalents
CE	Catechin equivalents
DEX	Dexamethazone
COX	Cyclooxygenase

NMDA

N-methyl D-aspartate

## **1. Introdução**

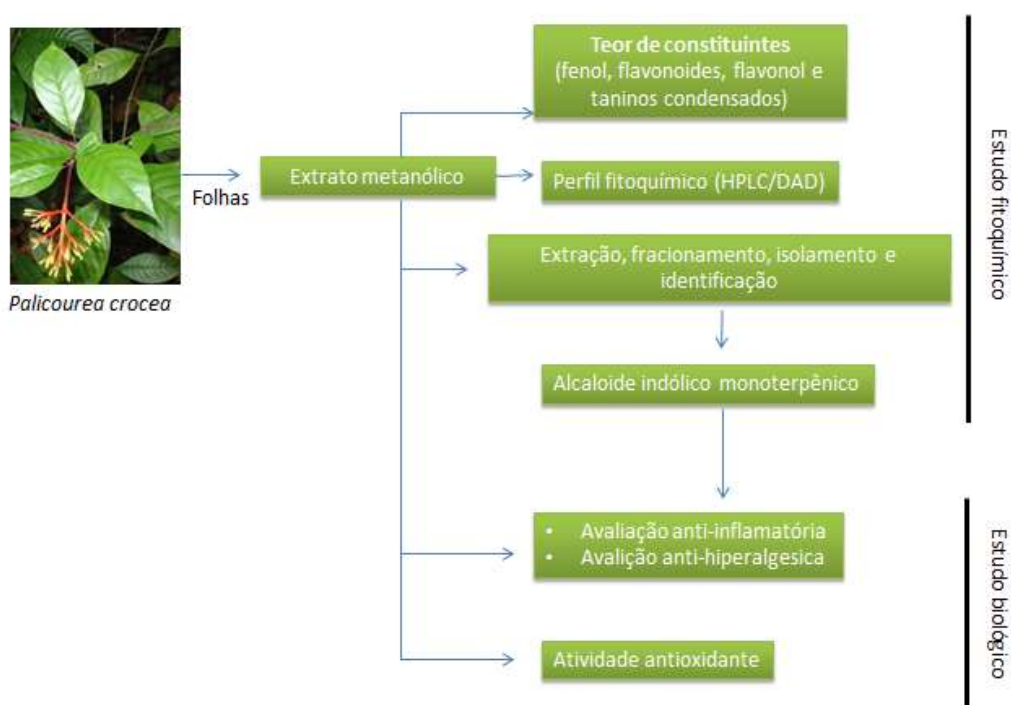
A definição de planta medicinal pela Organização Mundial de Saúde (OMS) é descrita como “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos “semisintéticos”. Foi divulgado pela OMS nas décadas de 80 e 90, que cerca de 65-80% da população de países em crescimento necessitavam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (OMS, 1998). Desde os primórdios da existência humana a primeira linha de defesa e tratamento para doenças foram as plantas medicinais.

O conhecimento adquirido através do tempo é passado para as novas gerações que buscam tratar, amenizar e curar os mais diversos tipos de doenças e sintomas. O conhecimento etnobotânico faz parte da cultura humana e em populações isoladas são de extrema importância, pois muitas vezes é a única opção de tratamento disponível pela dificuldade de acesso aos medicamentos ou atendimento médico necessário, também é fundamental para a pesquisa científica, pois pode ser o ponto de partida na escolha das espécies a serem estudadas, seus efeitos e formas de utilização. Ao longo da história através de tentativa e erro foram descobertas inúmeras espécies úteis aos seres humanos, entretanto, sua utilização normalmente é baseada em conhecimento popular, sem qualquer validação científica ou estudos que comprovem sua eficácia com testes pré-clínicos e clínicos a fim de evitar problemas como toxicidade. Outra evidência no uso é a falta de conhecimento dos princípios ativos, a interação das moléculas de sua composição com outros compostos e efeitos de hiperdosagem (TUROLLA e NASCIMENTO, 2006).

Apesar de nos últimos anos o número de pesquisa com plantas medicinais terem aumentado significativamente das cerca de 550.000 espécies de plantas distribuídas pelo globo apenas um pequeno grupo de espécies tem sido investigadas quanto as suas atividades biológicas e farmacológicas. A megadiversidade do Brasil é uma das mais ricas do mundo, com cerca de 35 mil espécies vegetais distribuídas em diversos biomas (BFG, 2015), das quais menos de 1% foi realizado algum tipo de estudo relacionado ao seu potencial medicinal. A facilidade de acesso, os baixos custos e por se tratar de produtos naturais que apresentam efeitos biológicos, as plantas medicinais despertam o interesse da pesquisa científica em diversas áreas com o objetivo da descoberta de novas substâncias de interesse humano ou alternativas naturais para o tratamento de males

conhecidos. Dessa forma, a pesquisa com produtos naturais se torna extremamente relevante para validar sua utilização popular com segurança e maior eficácia (SILVA *et al.*, 2010; MELO *et al.*, 2011).

Dentro deste enfoque, considerando os estudos sobre o gênero *Palicourea* (Tabela 1), e a presença de alcaloides, nos propusemos a realizar o estudo de avaliação da atividade antioxidante, anti-inflamatória e anti-hiperalgesica do extrato metanólico das folhas e alcaloide majoritário isolado de *Palicourea crocea* (Sw.) Schult. conforme ilustrado pelo fluxograma que mostra a descrição das atividades desenvolvidas.



## 2 Revisão Bibliográfica

### 2.1 *Palicourea*

O gênero *Palicourea* (estritamente relacionado com gênero *Psychotria*) pertence à tribo Psychotriae da família Rubiaceae e inclui aproximadamente 230 espécies de arbustos ou árvores pequenas. Algumas espécies deste gênero são usadas na região centro-oeste do Brasil para tratar o câncer e na terapia diurética pela população, no

entanto, outras espécies apresentam alta letalidade como *P. marcgravii* St. Hil. (erva de rato), que no Brasil representa uma das primeiras plantas venenosas estudadas no Brasil, devido à sua toxicidade aguda e palatabilidade, podendo ser letal em bovinos, por conter o composto tóxico de organofluorina (HARTWELL 1971, GÓRNIAC *et al.*, 1992; TOKARNIA *et al.* 2000; KEMMERLING W. 1996, OLIVEIRA 1963, MORAES-MOREAU RL *et al.*, 1995, LEE ST *et al.*, 2012).

Em levantamento bibliográfico de espécies de *Palicourea* em relação a composição química, destacam-se por apresentarem uma gama de metabolitos secundários dentre eles alcaloides triterpenos, cumarinas, ácidos fenólicos e peptídeos macrocíclicos (Tabela 1).

**Tabela 1.** Compostos isolados e identificados em espécies de *Palicourea* no período de 1975-2016.

Espécie	Composto	Referência
<i>P. acuminata</i>	<b>Alcaloides:</b> bahienosida B ; desoxicordifolina ; 5 $\alpha$ -carboxi-strictosidina ; lagambosídeo	BERGER <i>et al.</i> , 2015.
<i>P. adusta</i>	<b>Alcaloides:</b> lialosídeo ; ( <i>E</i> )- <i>O</i> -(6')-cinamoil-4"-hidroxi-3"-metoxi-lialosídeo ; ( <i>E</i> )- <i>O</i> -(6')-cinamoil-4"-hidroxi-3",5"-dimetoxi-lialosídeo	VALVERDE <i>et al.</i> , 1999.
	<b>Alcaloide:</b> calicantina	WOO-MING e STUART <i>et al.</i> , 1975.
<i>P. alpina</i>	<b>Noirisoprenoide:</b> vomifoliol	STUART e WOO-MING <i>et al.</i> , 1975.
	<b>Alcaloide:</b> palinina (estereoquímica indefinida)	STUART e WOO-MING <i>et al.</i> , 1974.



**Tabela 1.** Compostos isolados e identificados em espécies de *Palicourea* no período de 1975-2016. (Cont.)

Espécie	Composto	Referência
<i>P. condensata</i>	<b>Ciclotídeo:</b> palicoureína	BOKESCH <i>et al.</i> , 2001.
	<b>Alcaloides:</b> calicantina ; ácido estrictosidínico ; ácido <i>epi</i> -strictosidínico ; cetona estrictosidínica	do NASCIMENTO <i>et al.</i> , 2006.
	<b>Alcaloide:</b> ácido estrictosidínico trissacarídeo	do NASCIMENTO <i>et al.</i> , 2008.
<i>P. coriacea</i>	<b>Ésters aromáticos:</b> ( <i>E</i> )-metil-4-hidroxi-3,5-dimetoxicinamato; ( <i>E</i> )-metil-4-hidroxi-3-metoxicinamato; ( <i>E</i> )-metil-4-hidroxicinamato; ( <i>Z</i> )-metil-4-hidroxicinamato;	
	<b>Alcaloide:</b> calicantina ;	da SILVA <i>et al.</i> , 2008.
	<b>Triterpeno:</b> ácido ursólico ;	
	<b>Antraquinona:</b> 2-hidroxi-3-metilantraquinona; <b>Ácidos aromáticos:</b> ácido 4-metoxibenzoico; ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico, metil 4-hidroxibenzoato;	
	<b>Hidantoína:</b> alantoína	
	<b>Alcaloides:</b> croceaínas A (17) e B (18)	DÜSMAN <i>et al.</i> , 2004.
<i>P. crocea</i>	<b>Alcaloides:</b> braquicerina (19); palicroceaína (20); ácido estrictosidínico (13)	BERGER <i>et al.</i> , 2015.
	<b>Alcaloides:</b> croceaína A (17); psicolatina (21); <i>N</i> -óxido, 3,4-dihidro-1-(1- $\beta$ -D-glicopiranosiloxi-1,4a,5,7a-tetrahidro-4-metoxicarbonilciclopenta[c]piran-7-il)- $\beta$ -carbolina- <i>N</i> <sup>2</sup> -óxido (22)	NARINE <i>et al.</i> , 2009.
<i>P. demissa</i>	Ésteres metílicos de ácidos graxos;	
	<b>Esteroides:</b> sitosterol; estigmasterol;	
	<b>Triterpeno:</b> 3-friedelanona ;	
	<b>Cumarinas:</b> escopoletina (35); isoescopoletina ; umbeliferona ;	EL-SEEDI, 1999.
	<b>Ácidos aromáticos:</b> ácido protocatecuico, ácido vanílico e isovanílico.	
<i>P. domingensis</i>	<b>Alcaloide:</b> quimonantina	RIPPERGER, 1982.

**Tabela 1.** Compostos isolados e identificados em espécies de *Palicourea* no período de 1975-2016. (Cont.)

Espécie	Composto	Referência
<i>P. fendleri</i>	<b>Alcaloides:</b> calicantina e quimonantina	NAKANO e MARTÍN, 1976.
<i>P. longiflora</i>	Ácido monofluoracético; salicilato de metila; oxalato de cálcio	COELHO <i>et al.</i> , 2007.
<i>P. marcgravii</i>	Fluoroacetato, N-metiltiramina ; <b>Alcaloide:</b> 2-metiltetrahydro-β-carbolina	KEMMERLING, 1996.
	<b>Alcaloide:</b> palicosídeo	MORITA <i>et al.</i> , 1989.
<i>P. ovalis</i>	<b>Pseudo-Alcaloide:</b> cafeína	GÓRNIAK <i>et al.</i> , 1986.
	<b>Alcaloide:</b> calicantina	de GARCIA <i>et al.</i> , 1997.
<i>P. padifolia</i>	<b>Alcaloides:</b> estriictosidina ; lialosídeo ; ( <i>E</i> )- <i>O</i> -(6')-(4''-hidroxi-3'',5''-dimetoxi)-cinamoil-lialosídeo	BERGER <i>et al.</i> , 2015.
<i>P. rigida</i>	<b>Ciclotídeo:</b> parigidinbr1	PINTO <i>et al.</i> , 2012.
	<b>Alcaloide:</b> <i>E</i> -valesiachotamina	SOARES <i>et al.</i> , 2012.
	<b>Flavonoides:</b> quercetina 3- <i>O</i> -β-D-glicosídeo ; quercetina 3- <i>O</i> -soforosídeo(39); isoramnetina 3-glicosídeo	ROSA <i>et al.</i> , 2010.
	<b>Triterpenos:</b> 3-friedelanona ; 3β-hidroxifriedelana ; 30-hidroxifriedelan-3-ona	BOLZANI <i>et al.</i> , 1992.
	<b>Iridoide:</b> 1- <i>epi</i> -loganina	MOREL <i>et al.</i> , 2011; LOPES <i>et al.</i> , 2004.

adaptado de Moraes, 2017.

Em relação a estudos biológicos, *Psychotria deflexa* (sinonímia de *Palicourea deflexa*) apresentou moderada toxicidade em estágios embrionários de peixe (CL<sub>50</sub> = 72,18 ± 4,54µg/ml) e ao ser testado na inibição de da enzima Acetilcolinesterase (AChE) apresentou CI<sub>50</sub> = 50,65 ± 4,51µg/mL o que comprova que o gênero possui potencial inibitório de enzimas associadas ao processo neurodegenerativo. (BERTELLI *et.al*, 2017).

As folhas de *Palicourea rigida* são popularmente utilizadas para o tratamento de infecções do trato urinário feminino e desordens no pulmão e rins. Ao testar a fração hexano do extrato das folhas foi verificado a inibição significativa ( $p < 0,05$ ) do edema na orelha de camundongos provocado por óleo de croton. (Alves *et. al.*, 2016). O extrato etanólico das folhas de *P. rigida* também apresentou significativa inibição de edema, da infiltração de células inflamatórias e vasodilatação em camundongos provocado por óleo de croton, ácido araquidônico, fenol e capsaicina ( $p < 0,01$ ) assim como a atividade da mieloperoxidase ( $p < 0,01$ ) (PINHEIRO *et. al.*, 2017).

O extrato etanólico das folhas de *P. coriacea* apresentaram efeito diurético aumentando significativamente ( $p < 0,05$ ) o volume de urina ao longo de 24 horas em ratos e assim comprovando seu uso etnobotânico (Freitas *et. al.*, 2011). Além disso, o extrato bruto de *P. coriacea* demonstrou não apresentar atividade citotóxica e genotóxica nas concentrações de 5, 10 ou 15 mg de extrato por mL (PASSOS *et al.*, 2010).

O extrato das folhas de *P. marcgravii* mostrou-se eficiente frente a inseticida contra pulgões e cigarrinha em frutíferas ( $p < 0,05$ ) (Gonzaga *et al.*, 2008) e acaricida contra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (carrapato de boi). Ambas atividades foram atribuídas a presença de monofluocerato (SILVA *et al.*, 2011).

O alcaloide valesiachotamina isolado de *P. rigida*, apresentou ação antiproliferativa contra células de melanoma com valores de  $IC_{50}$  próximos de  $15 \mu M$  (Soares *et al.*, 2012). Palicoureína isolado de *P. condensata*, inibiu os efeitos citopáticos do vírus HIV com um  $EC_{50} = 0,10 \mu M$  (concentração que induz metade do efeito máximo) e  $IC_{50} = 1,5 \mu M$  (concentração que inibe metade dos efeitos) (BOKESCH *et al.*, 2001).

## 2.2. *Palicourea crocea* (Sw.) Schult.

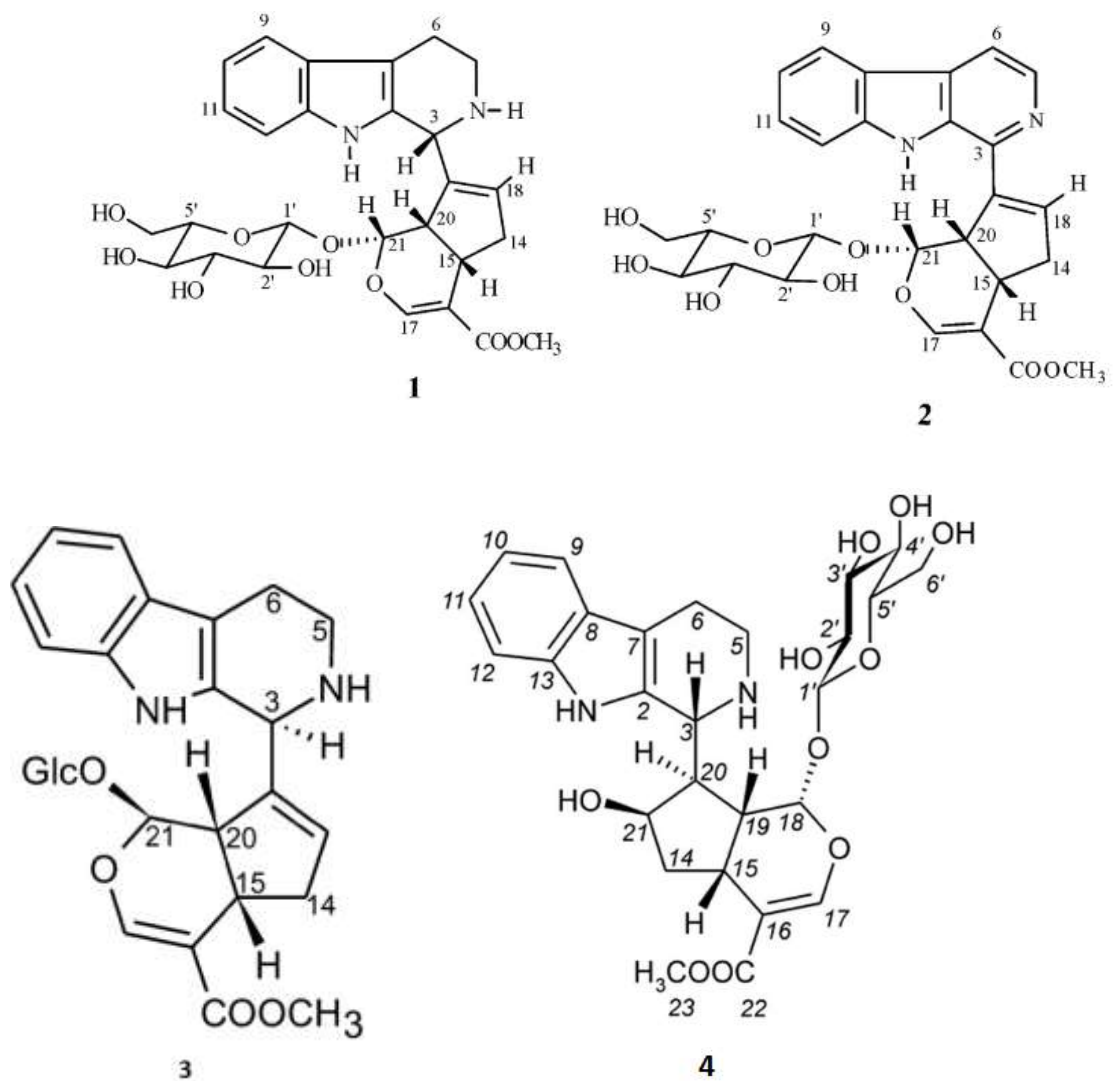
Conhecido como "palicourea vermelha e / ou amarela", *P. crocea* (Figura 1) é um arbusto, encontrado desde o sul do México, estendendo a América Central e do Sul, para a região sul do Brasil e Paraguai (Francis, 2004). Esta espécie não é considerada uma planta tóxica por não possuir monofluocerato de Sódio (Andrade e Matos, 1968, Peixoto *et al.*, 1987, Pereira *et al.*, 2003, Tokarnia *et al.*, 2000). Estudos químicos relataram o isolamento de alcaloides, tais como croceína A (1) e B (2), psicolatina (3), braquicerina (4) e palicroceína (5) (Figura 2) (Düsman *et al.*, 2004, Narine e Maxwell 2009, Berger *et al.*, 2015). Estudos com extrato obtido das folhas demonstraram potencial alelopático

(Formagio *et al.*, 2014) e inibição na germinação carpogênica (Zanella *et al.*, 2015) e nenhuma investigação biológica foi relatada para esta espécie.



Figura 1 *Palicourea crocea*

Fonte: plantlist.org



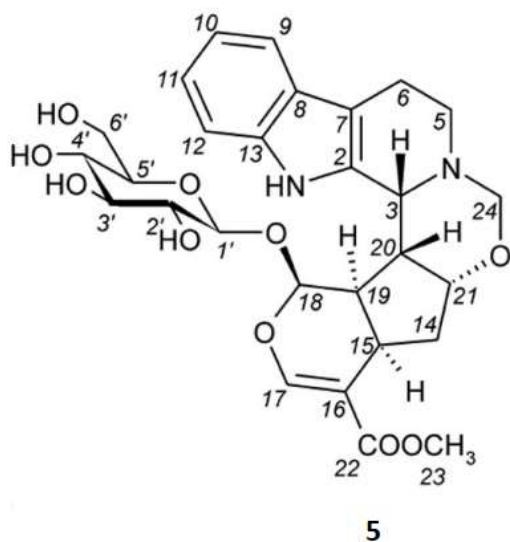


Figura 2 alcaloides isolados de espécies de *Palicourea*: croceaina A (1) e B (2), psicolatina (3), braquicerina (4) e palicroceína (5)

Esta classe de alcaloides (indólicos) pode ser originada pela condensação de um monoterpeno secologonina com aminoácidos ou a amina correspondente: tiramina produzindo alcaloides isoquinolinicos, triptofano formando indol-carboxílico e triptamina formando alcaloides indol-monoterpenicos. As principais características de todos os alcaloides indolicos monoterpenicos é a rota biosintética que apresenta strictosidina como precursor e o triptofano como precursor chave originando o sistema indol, que pode ser proposto pela rota biosintética via ácido antranílico ( Fig. 3) (Cordell, 1981).

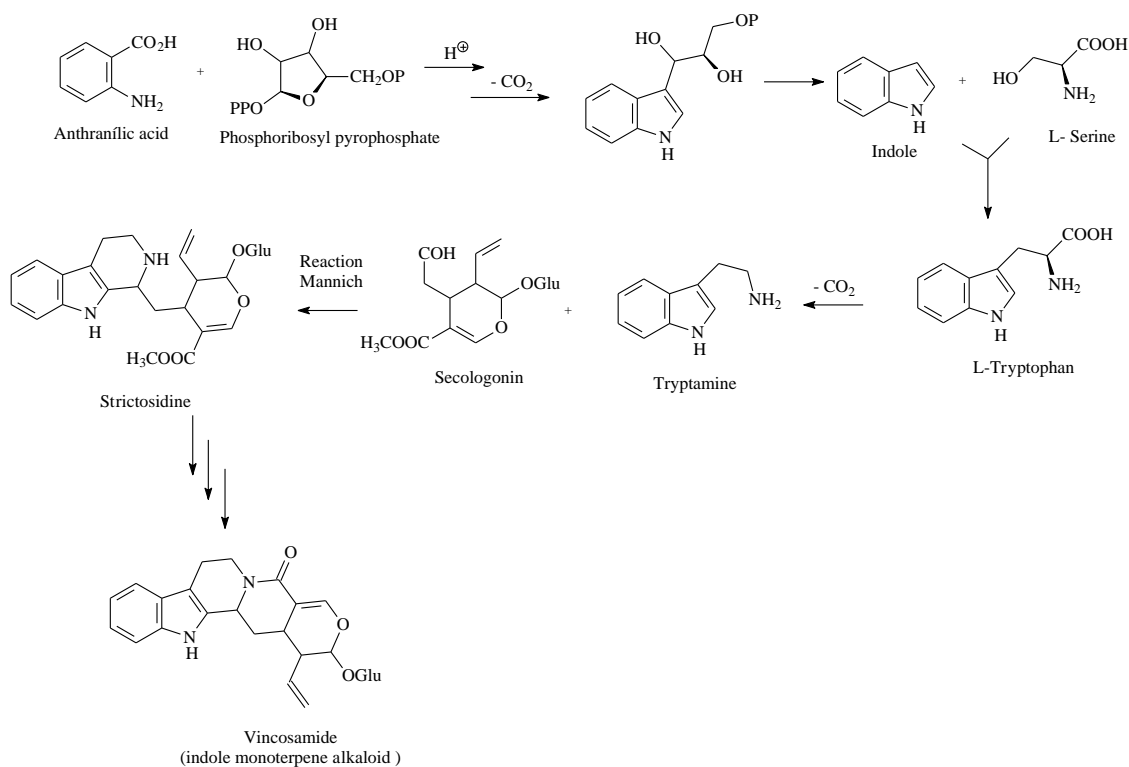


Figura 3: Rota biosintética proposta para alcaloides indólicos monoterpênicos

### 2.3 Estresse oxidativo

O oxigênio desempenha um papel fundamental nos processos biológicos dos seres vivos como respiração e digestão, durante estes processos, os radicais livres são formados. As espécies reativas de Oxigênio e Nitrogênio (EROs e ERNs respectivamente) são as formas mais comuns encontradas em sistemas biológicos sendo os mais comuns o radical superóxido ( $O_2^-$ ), o radical hidroxila ( $OH^\cdot$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Quando ocorre um desequilíbrio entre a capacidade do organismo de neutralizar e a quantidade de radicais livres, isso pode levar ao estresse oxidativo, onde as moléculas com elétrons não emparelhados podem danificar estruturas celulares para se estabilizar e, assim, desencadear processos inflamatórios e doenças como câncer, Alzheimer e Parkinson (Lobo *et al.*, 2010). O estresse oxidativo pode atuar como indutor do processo inflamatório por alterar a síntese e estrutura de proteínas.

### 2.4 Antioxidantes

Antioxidantes são substâncias capazes de neutralizar os radicais livres atuando como doadores de elétrons que promovem a estabilidade dos radicais livres impedindo-

os de causarem danos no organismo. Os antioxidantes possuem origens distintas podendo ser endógenos de origem enzimáticas ou exógenos provenientes do processo de alimentação. O sistema enzimático é formado por enzimas produzidas pelos organismos para combater o excesso de radicais livres. Destacam-se as enzimas superóxido dismutase, a catalase e a glutathione peroxidase. O outro tipo de defesa contra os agentes oxidativos é a defesa não enzimática ou exógena. Composta por diversas substâncias adquiridas através da alimentação como a vitamina C (GONZÁLEZ *et. al*, 2002).

## 2.5 Flavonoides

Flavonoides são uma classe de polifenóis, que são classificados de acordo com a sua origem biossintética. Sua estrutura geral é composta por dois anéis aromáticos ligados entre eles por uma ponte de 3 carbonos contendo um heteroátomo de Oxigênio. (C6-C3-C6). Como um dos principais constituintes de frutas e vegetais, os flavonóides são considerados uma classe importante dos metabólitos secundários das plantas atuando como pigmentos acessórios durante o processo fotossintético e promovendo potente atividade antioxidante nos organismos promovendo a estabilização de radicais livres formados durante os processos metabólicos (SELEEM, PARDI & MURATA, 2017).

## 2.6 Inflamação

A inflamação é uma resposta local e autorregulada do organismo que dispõem-se a localizar, neutralizar, eliminar e reparar danos causados a células e tecidos e promover a cicatrização. É caracterizada por um conjunto de fenômenos bioquímicos, morfológicos e fisiológicos. A exposição das células a patógenos ou estímulos mecânicos físicos resultam na ativação e liberação de diversos mediadores responsáveis pelas características da área inflamada. O lipopolissacarídeo (LPS) é um dos principais constituintes da membrana plasmática de bactérias gram-negativas e ao entrar em contato com os receptores celulares dos macrófagos desencadeiam o efeito cascata do ácido araquidônico que promove a ativação de fatores de transcrição no núcleo que são responsáveis por transcrever genes pró-inflamatórios e a liberação de enzimas que irão atuar sobre a inflamação. (ABBAS *et al.*, 2010)

## 2.7 Processo inflamatório

Quando o antígeno entra em contato com a membrana celular desencadeia a produção de substâncias quimiotáticas no local lesionado promovendo alterações vasculares pela migração de células circulantes (diapese) (Cruvinel *et al.*, 2010). Os sinais clínicos no local inflamado são: rubor, calor, edema, dor, e a perda da função (Rock e Kono, 2008; Cruvinel *et al.*, 2010). A função biológica do processo inflamatório é a defesa do organismo com a finalidade de remoção do patógeno, seus fragmentos e substâncias residuais e dar início ao processo de restauração tecidual. Principalmente através de fagocitose as células circulantes neutralizam, diluem ou destroem os agentes nocivos (Ashley *et al.*, 2012).

De acordo com suas características o processo inflamatório pode ser classificado em agudo ou crônico. A inflamação aguda é uma resposta imediata ao tecido lesionado ou infectado e tem como resultado a cura da área afetada, ocorrendo por um breve período de tempo. É caracterizada pela migração de leucócitos no local inflamado eliminando o agente causador, resultado na restauração do tecido, enquanto que, a inflamação crônica dura por tempo indeterminado. Tem como propriedade o estímulo constante da inflamação, ou seja, o agente causador não é eliminado e persiste gerando danos no tecido. A inflamação crônica está relacionada a algumas doenças como artrite, aterosclerose, entre outras (Maskrey *et al.*, 2011; Tabas e Glass, 2013).

A histamina é um mediador inflamatório de origem celular (mastócitos, basófilos e plaquetas) que promove sua ação fisiológica por meio de interação com os receptores da célula-alvo, H1, H2 e H3. Ao interagir com H1 contração de músculos lisos em vários sistemas do corpo além de aumentar a permeabilidade dos capilares. Medicamentos denominados anti-histamínicos bloqueiam esses receptores impedindo a histamina de causar seus sintomas. Ao se ligar em receptores do tipo H2 aumenta liberação de ácido gástrico e a produção de muco nas vias aéreas. Receptores do tipo H3 estão intimamente relacionados com a produção e secreção de histamina por basófilos e mastócitos. Outro grupo presente no processo inflamatório são as citocinas com diversas funções como ativação do endotélio vascular, ativação de linfócitos, destruição local de tecidos e aumento do acesso de células efetoras (IL-1), aumento da permeabilidade dos vasos (TNF- $\alpha$ ), ativação de linfócitos (IL-6), recrutar neutrófilos, basófilos, NKs e células T para o local da infecção (IL-8) e ativação de células NK e indução a diferenciação de células TCD4 em Th1 (IL-12) e o entrar em contato com receptores NK1, promovem o



aumento do fluxo sanguíneo e a permeabilidade vascular, e ao se ligarem com receptores do tipo NK2, induzem a broncoconstrição. (MESQUITA *et. al*, 2017).

### 3 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antioxidante, anti-inflamatória e anti-hiperalgesica do alcaloide e extrato metanólico e alcaloide isolado das folhas de *P. crocea*.

#### 3.1 Objetivos específicos

Determinar o teor de fenólicos totais, flavonoides, flavonol e taninos condensados presente no extrato metanólico;

Perfil fitoquímico por HPLC-DAD do extrato metanólico;

Extração, fracionamento, isolamento e caracterização do principal alcaloide presente no extrato metanólico de *P. crocea*;

Avaliação da atividade antioxidante do extrato metanólico pelo método de sequestro de radicais livre DPPH, ABTS e peroxidação lipídica pelas espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS);

Avaliação *in vivo* da atividade anti-inflamatória pelo teste de edema de pata induzido por carragenina;

Avaliação da atividade anti-hiperalgesica pelo teste de pressão com aparelho do tipo *Von Frey*.

### 4. Manuscrito

#### **Antioxidant, anti-inflammatory and anti-hyperalgesic activities of alkaloid and extract methanolic from *Palicourea crocea***

Pedro Cruz de Oliveira Junior<sup>a</sup>, Carla Roberta Ferreira Volobuff<sup>b</sup>, Candida Aparecida Leite Kassuya<sup>b</sup>, Claudia Andrea Lima Cardoso<sup>c</sup>, Maria Helena Sarragiotto<sup>d</sup>, Zefa Valdevina Pereira<sup>a</sup> and Anelise Samara Nazari Formagio<sup>a,b\*</sup>

<sup>a</sup> *Faculty of Biological and Environmental Sciences, Federal University of Grande Dourados UFGD, Mato Grosso do Sul State, Brazil*

<sup>b</sup> *Faculty of Health Sciences, Federal University of Grande Dourados UFGD, Mato Grosso do Sul State, Brazil*

<sup>c</sup> *Chemistry, State University of Mato Grosso do Sul UEMS, Mato Grosso do Sul State, Brazil*

<sup>d</sup> *Chemistry, State University of Maringá UEM, Paraná, Brazil*

\*Corresponding author at: *Faculty of Biological and Environmental Sciences, Faculty of Health Sciences, UFGD, MS, Brazil*

E-mail address: [aneliseformagio@ufgd.edu.br](mailto:aneliseformagio@ufgd.edu.br) (A.S.N.Formagio)

## **Abstract**

Objectives: *Palicourea crocea* showed promising results in chemical investigations, which include the isolation of alkaloids; however, no biological analyses have been conducted so far to evaluate the antioxidant, anti-inflammatory and antinociceptive properties. Methods: The chemical composition of the methanolic extract from *P. crocea* leaves (MEPC) were investigated using high performance liquid chromatography (HPLC/PAD) method, and the concentrations of total phenolics, flavonoids, flavonols and condensed tannins also were determined, so is the isolation the principal alkaloid (PC-1) of this plant. The antioxidant activity of the MEPC and PC-1 were evaluated for free radical scavenging activity using the DPPH and ABTS; lipid peroxidation using malondialdehyde (MDA). MEPC (300, 100 and 50 mg/kg) and PC-1 (50 and 10 mg/kg)

also were tested in anti-inflammatory effects in carrageenan-induced mice paw edema and anti-hyperalgesic for cold sensitivity and mechanical hyperalgesia. Key findings: MEPC showed highest concentrations of phenolic and flavonoids compounds ( $\leq 800.35$  mg/g), revealed by HPLC-PDA analysis the caffeic acid, ferulic acid, rutin and quercetin. The MEPC displayed potent antioxidant activity for ABTS radical ( $IC_{50} = 68.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) and MDA (74%). The oral administration of the MEPC (300, 100 and 50 mg/kg) and croceaine A alkaloid PC-1 (50 and 10 mg/kg) exhibited an anti-oedematogenic effect in Cg-induced paw oedema in 2 and 4h. Also reduced significantly the mechanical hyperalgesia and the cold response to acetone in mice, at 3 and 4 h after injection. Conclusions: For the first time, evaluating antioxidant and systemic anti-inflammatory and anti-hyperalgesic activities from *P. crocea*.

Keywords: antioxidant; anti-hyperalgesic; croceaine A; douradina; oedema.

## Introduction

The *Palicourea* (closely related to *Psychotria*) belongs to the tribe Psychotriace, Rubiaceae family and includes approximately 200 species of shrubs or small trees.<sup>[1]</sup> Some species from this genus are used in Midwestern Region of Brazil for to treat cancer and in diuretic therapy by the population;<sup>[2]</sup> however, species this genus presenting high lethality, *i.e.* *P. marcgravii* St. Hil., in Brazil represents the first poisonous plant, due to its acute toxicity and palatability, to contain the toxic organofluorine compound.<sup>[3-8]</sup>

*Palicourea crocea* (Sw.) Roem. & Schult., known as “douradina”, “douradão” and douradão-do-campo” is not considered a toxic plant <sup>[9-13]</sup>, and is used by Ribeirinhos in the North Araguaia microregion, Mato Grosso, Brazil as infusion or decoction to infection in geral, edema, improve circulation, diuretic, high blood pressure, weakness, itching and accelerated heartbeat.<sup>[14]</sup> Chemical studies this specie reported the isolation of alkaloids, such as croceaines A and B, psychollatine, 3, 4-dihydro-1-(1- $\beta$ -glucopyranosyloxy-1, 4a, 5, 7a-tetrahydro-4-methoxycarbonylcyclopenta [c] pyran-7-yl)- $\beta$ -carboline-N-2-oxide, brachycerine and palicroceaine.<sup>[15-17]</sup> Studies with extract obtained of the leaves have demonstrated allelopathic potential<sup>[18]</sup> and inhibition on carpogenic germination.<sup>[19]</sup> No biological or animal model investigation has been reported for this species.

In the present work, we describe the isolation and identification of the known monoterpene indole alkaloids, croceaine A (PC-1- Fig.1) previously isolated also from *P. crocea* by Dusman *et al.*<sup>[15]</sup> Therefore the main objective of the study was to assess the antioxidant and anti-inflammatory, anti-hyperalgesic activity of methanolic extract and alkaloid (PC-1), and also determined the concentrations of phenolic compounds, condensed tannins, flavonoids, flavonol and HPLC/PAD analysis.

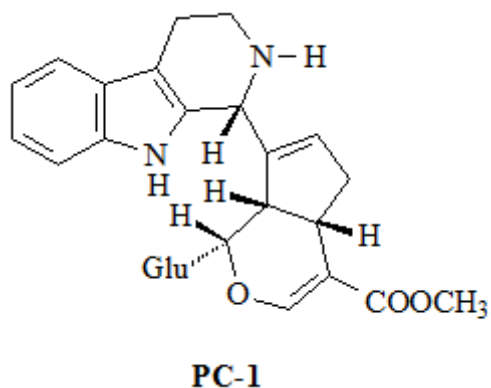


Figure 1 Structure of croceaine A

## Experimental Section

### Apparatus, solvents and chemicals

All chemical reagents and solvents were of analytical quality. Distilled water was obtained from a Quimis® 341 pilsen water distiller (SP, Brazil). <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded on a Varian Mercury Plus spectrometer operating at 300 MHz and 75.5 MHz, respectively, using CD<sub>3</sub>OD as solvent, and tetramethylsilane (TMS) as internal reference. λ-Carrageenan, phosphate-buffered saline (PBS), Tween 20%, dexamethasone, and zymosan, 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), butylated hydroxytoluene (BHT), 2,2-azinobis (3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS), quercetin, catechin, and β-carotene were obtained from Sigma Chemical Co. (MO, USA). Analytical-grade, n-hexane, ethyl acetate, potassium persulfate, Folin-Ciocalteu, sodium carbonate from Dinamica (SP, Brazil), sulfuric acid, methanol, ethanol, hydrochloric acid, ascorbic acid, chloroform, linolenic acid, gallic acid, aluminum chloride, sodium acetate, and vanillin were obtained from Vetec (RJ, Brazil).

### Animals

Male *Swiss* mice (25–35 g) were obtained from were from Central biotery, UFGD (Dourados, Brazil). The animals were kept under standard laboratory conditions, with a controlled environment at  $20 \pm 2$  °C (12 h light and 12 h dark cycle), water and food *ad libitum*. The Institutional Ethics Commission from UFGD approved the procedures and protocols adopted in the study authorization number 17/2017.

### **Plant material, preparation extract and isolation of the alkaloid**

Aerial parts (branch and leaves) from *P. crocea* were collected in May 2016, in Dourados, MS, Brazil, and identified by Dr. Zefa Valdevina Pereira of the Federal University of Grande Dourados, UFGD. The voucher specimen 4487 was deposited at the Herbarium this University. Dried and ground material (520 g) was extracted by maceration with methanol, at room temperature for 15 days. After filtration, concentrated under reduced pressure and lyophilized the methanolic extract of *P. crocea* (MEPC, 67g, yield 12.9%), was obtained. Part of the MEPC (32 g) was dissolved in methanol: water (1:1) and partitioned with chloroform and ethyl acetate. The chloroform fraction showed positive test for alkaloids by using Dragendorff's reagent. Purification of the part of chloroform fraction by repeated column chromatography on silica gel and preparative TLC afforded the alkaloid PC-1 (67.8 mg). The isolated compound was identified by comparing their spectroscopic data ( $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR) with data from the literature.<sup>[15]</sup>

### ***Concentrations of Constituents***

#### ***Total Phenolics***

100  $\mu\text{L}$  of MEPC (1 g/L in methanol) were mixed with 1.0 mL of distilled water and 0.5 mL of folin-ciocalteu's reagent (1:10 v/v). After mixing, 1.5 mL of 2% aqueous sodium bicarbonate was added and after 30 min, absorbance was measured at 765 nm.<sup>[18]</sup> Total phenolic concentration was expressed as gallic acid equivalent (GAE) in mg/g of extract. All assays were carried out in triplicate.

#### ***Total flavonoids and flavonol***

500  $\mu\text{L}$  of MEPC (1 g/L in methanol) was mixed with 1.50 mL of ethanol (95%), 0.10 mL of the aluminum chloride ( $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 10%), 0.10 mL of sodium acetate ( $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , 1 M) and 2.80 mL of distilled water. After incubation for 40 min, absorbance was measured at 415 nm. The flavonol concentration was determined by mixture of the 2 mL of MEPC, 2 mL  $\text{AlCl}_3$  (2%, ethanol) and 3 mL of sodium acetate (50 g/L), followed of incubated for 2.5 h at 20 °C, and read at 440 nm. To calculate the concentration of flavonoids and flavonol, we prepared a calibration curve to obtain the linear equation, using quercetin as standard, and the resulted was expressed as quercetin equivalents (QE) in mg/g of extract. <sup>[18]</sup> All assays were carried out in triplicate.

### ***Condensed Tannins***

MEPC was mixed with 5 mL vanillin-HCl (8% conc. aq. HCl and 4% vanillin in methanol), and after 20 min the absorbance was read in 500 nm. We prepared a linear regression, using catechin as standard and the resulted expressed as catechin equivalents (CE) in mg/ gram of extract. <sup>[18]</sup> All assays were carried out in triplicate.

### **HPLC-DAD**

The extract was analyzed in an analytical LC (LC-6AD, Shimadzu, Kyoto, Japan) system with a diode array detector (DAD) monitored at  $\lambda = 200 - 600$  nm. The LC column was a C-18 (25 cm x 4.6 mm; particle size, 5  $\mu\text{m}$ ; Luna, Phenomenex, Torrance, CA, USA). In each analysis, the flow rate and the injected volume were set as 1.0 mL/min and 10  $\mu\text{L}$ , respectively. All chromatographic analyses were performed at 23°C. Elution was carried out using an binary mobile phase of water with 6% acetic acid and 2mM sodium acetate (eluent A) and acetonitrile (eluent B). The following applied gradient: 5% B (0 min), 15% B (30 min), 50% B (35 min) and 100% B (45 min). Standards of the vanilic acid, *p*-methylbenzoic acid, caffeic acid, ferrulic acid, *p*-coumaric acid, benzoic acid, cinnamic acid, rutin, sinapic acid, quercetin, luteolin, apigenin, vaniline (Sigma, 97%) were prepared in the concentration initial of 100  $\mu\text{g/mL}$ . The concentrations of compounds were determined by extern calibration after dilutions appropriated in the range of 0.01-10  $\mu\text{g/mL}$ .

## **Antioxidant assays**

### ***Free-radical scavenging activity – DPPH and ABTS***

Methanolic extract (MEPC) and compound (PC-1) were determined by the 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and azinobis-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) reagent.<sup>[18]</sup> For DPPH test, several concentrations of the samples in MeOH were added to 2 mL of daily prepared DPPH solution (4.7 mg in 75 mL of MeOH). The mixture was shaken and left to stand at room temperature in the dark, and after 30 min, absorbance was measured at 517 nm. A DPPH solution without addition of the samples was used as control.

In ABTS assay, 7.0 mM ABTS and 140 mM potassium persulphate were mixed and kept in the dark for 16 h at ambient temperature, however before usage, the ABTS+ solution was diluted to get an absorbance of  $0.700 \pm 0.05$  at 734 nm with ethanol. 3 mL of ABTS+ solution was added to 30  $\mu$ L of solutions of different concentrations of the sample, and the absorbance was measured at 734 nm after 30 min.

The BHT was used as positive control.

### ***Malondialdehyde assay - MDA***

Malondialdehyde (MDA) was used to evaluation of lipid peroxidation,<sup>[20]</sup> using rat brain homogenates. Several aliquots of the samples (MEPC and PC-1) were added to 3 mL of homogenate. After 1 hour of incubation at 37 °C, 1.2 mL of trichloroacetic acid was added, centrifuged to collect the precipitated proteins. The supernatant was heated with 1 mL of an aqueous solution of 0.67% thiobarbituric acid for 15 min at 100 °C, and absorbance was measured at 535 nm. The BHT was used as positive control.

### **Carrageenan-induced mice paw edema**

Using seven groups of mice (n = 6), totaling 42 animals, were orally (p.o.) treated with MEPC (300, 100 and 50 mg/kg), PC-1 (50 and 10 mg/kg), vehicle (saline solution 0,9 %)

or subcutaneously (s.c.) with the anti-inflammatory drug dexamethasone (1 mg/kg). After 1 h, the animals received a 50  $\mu$ L subcutaneous injection of carrageenan (Cg, 300  $\mu$ g) dissolved in sterile 0.9% saline into the right hind paw. The contralateral paw received only saline and was used as the control. Oedema was measured after 0.5, 1, 2 and 4 h plethysmometer (PANLABHarvard).<sup>[30]</sup>

### **Mechanical hyperalgesia**

Seven groups of mice (n=6) were treated with a vehicle (saline solution 0,9 %, p.o.), MEPC (300, 100 and 50 mg/kg, p.o.), PC-1 (50 and 10 mg/kg, p.o.) or injected with dexamethasone (1 mg/kg; s.c.). After 1 h from respective treatment, an intraplantar injection of a solution containing carrageenan (300  $\mu$ g/ paw) was performed for each animal in the right hind paw while in the left hind paw an injection of saline was made. After carrageenan treatment, mice were housed in suspended platform to analyze the mechanical hyperalgesia. The analgesymeter (Insight®-EFF 301-Digital analgesymeter-von Frey) was used to test mechanical response 3 and 4 h after Cg administration.<sup>[31]</sup>

### **Cold sensitivity**

Cold response was evaluated after the acetone drop test as described by Decosterd, *et al.*<sup>[29]</sup> Male mice (n=6) were treated by oral route with MEPC (300, 100 and 50 mg/kg), PC-1 (50 and 10 mg/kg), saline solution (control) or dexamethasone (1 mg/kg; s.c.). The animals were housed in suspended platform and acetone (20  $\mu$ L) was distributed in the skin of plantar surface of the right hind paw. The cold sensitivity reaction as indicated by paw licking, shaking or rubbing the paw was observed and recorded. The duration of the testing was 30 s.

### **Statistical analysis**

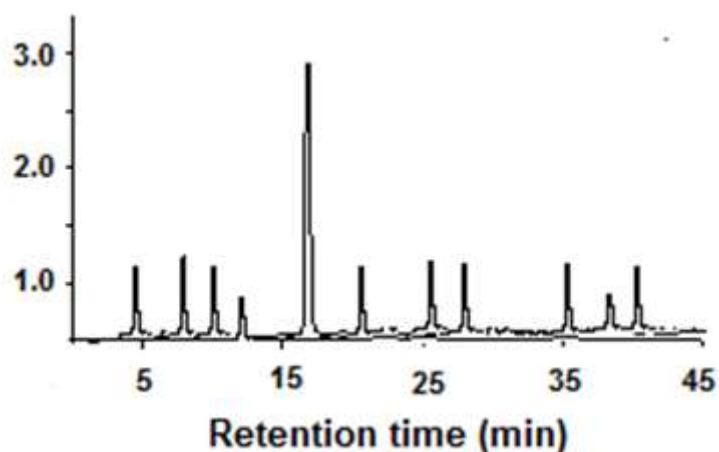
Data are presented as the mean  $\pm$  standard error of the mean. Difference among groups was evaluated by analyses of variance (one-way ANOVA) followed by the Newman–Keuls posttest. Statistical differences were considered significant at  $p < 0.05$ .



## Results and Discussion

PC-1 was isolated as an amorphous solid of the chloroform fraction and  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data confirmed the presence of the monoterpene indole alkaloid croceaine A (PC-1) which was previously isolated from *P. crocea*.<sup>[15,16]</sup> Alkaloids derived from the strictosidine (tryptamine–iridoid) were reported in *P. adusta* Standl.,<sup>[21]</sup> *P. coriacea* (Cham.) K. Schum.,<sup>[22,23]</sup> *Psychotria umbellata*<sup>[24]</sup> and *P. acuminata* (Benth.) Borhidi.<sup>[17]</sup> These alkaloids are obtained by the metabolic route whose amino acid of origin is tryptophan and a single precursor to strictosidine produced by the condensation of a molecule of tryptamine with secologanine, elaborated via geraniol, from the molecules of the mevalonic acid.<sup>[25]</sup>

Methanolic extract from *P. crocea* (MEPC) showed highest concentrations of phenolic compounds ( $800.35 \pm 9.45$  mg GAE/g extract), followed by flavonoids ( $719.40 \pm 5.66$  mg QE/g extract), when compared to concentration of flavonols ( $240.80 \pm 12.39$  mg QE/g extract), and condensed tannins ( $94.10 \pm 15.20$  mg CE/g extract). These results were superior of the reported by our research group, when assessed the content of phenolic and flavonoids compounds of the leaves of this species collected in 2014,<sup>[18]</sup> which may have been influenced by climatic conditions. The MEPC was subjected to quantification by LC-DAD of the phenolic acids and flavonoids. The compounds caffeic acid ( $t_r = 8.64$  min; 54.6 mg/g), ferulic acid ( $t_r = 17.28$  min; 211.4 mg/g), rutin ( $t_r = 25.10$  min; 63.1 mg/g) and quercetin ( $t_r = 35.33$  min; 65.9 mg/g) were identified employing standards (Figure 2).



**Figure 2** Chromatogram of the MEPC by LC-DAD.

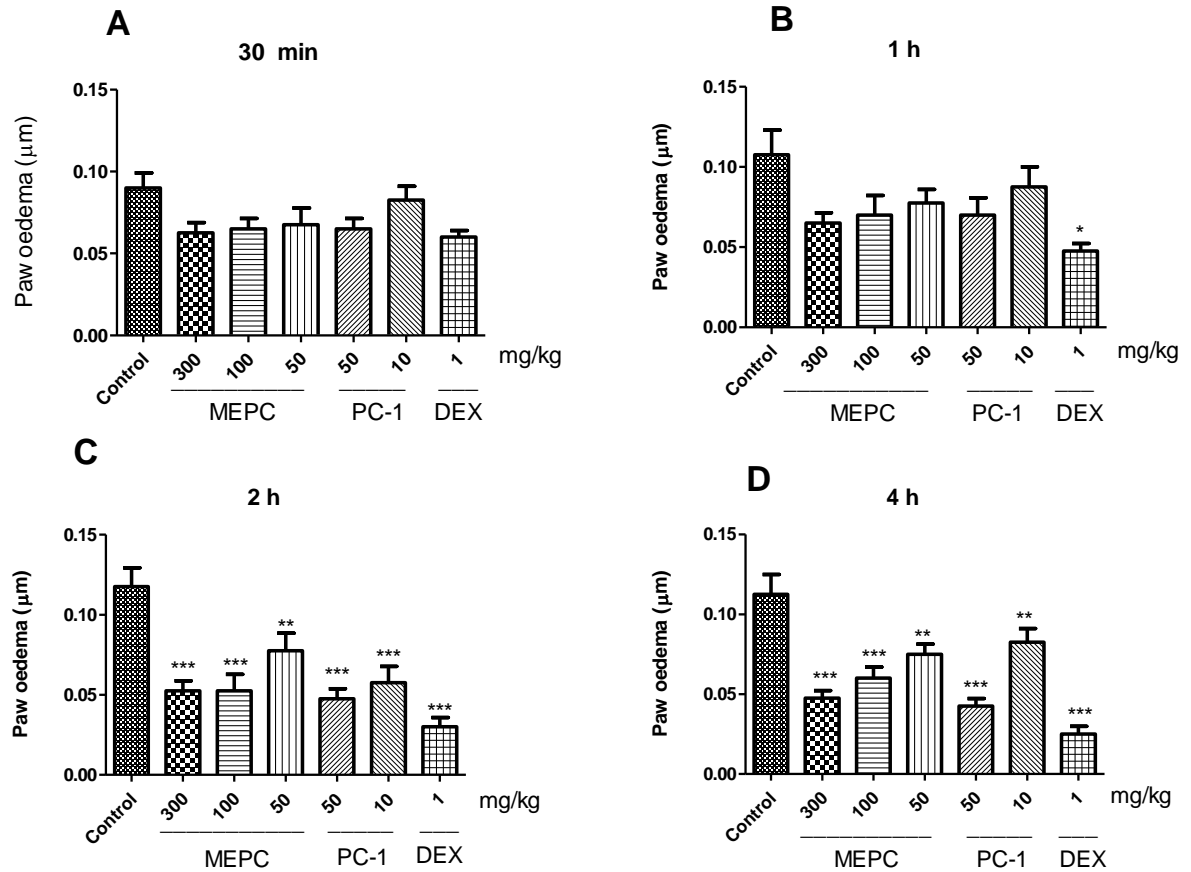
The antioxidant activity can be directly related to presence of phenolic e/or flavonoids compounds, by number and position of free hydroxyl groups connected to the aromatic structure, which could be a result of their hydrogen donating ability.<sup>[26]</sup> Three assays (DPPH, ABTS and MDA) were employed to assess antioxidant activity of the MEPC, and the results have been demonstrated by the value of IC<sub>50</sub>, which corresponds to the concentration giving 50% inhibition. The MEPC displayed potent scavenging activity for ABTS radical in a concentration-dependent manner with ranging from 5 to 250 mg/mL, with IC<sub>50</sub> values of 68.5 µg/ mL, not showed activity by DPPH method (> 250 µg/ mL). The MDA assay, a product derived from lipid peroxidation, demonstrated decreased MDA production (74%), comparable to butylated hydroxytoluene (BHT), 84%. The compounds present in the extract as caffeic acid, ferulic acid, rutin and quercetin, can be partly responsible for the antioxidant activity in front of the evaluated methods.

Quercetin and rutin have reported in the literature their potent antioxidant activity for different types of tests.<sup>[32-34]</sup> In relation to caffeic and ferulic acid are examples of important natural phenolic antioxidants, obtained from metabolism of phenylalanine and tyrosine by Shikimate pathway in plants. Other therapeutic properties such as UV-protection, anticarcinogenic, anti-inflammatory, cardiovascular protection and against diseases neurodegenerative, at least in part, because of its strong antioxidant activity, that effectively scavenges superoxide anion radical and inhibits the lipid peroxidation.<sup>[35-37]</sup> These compounds showed this effects by virtue of its phenolic hydroxyl group in its structure.

This, the antioxidant potential of MEPC can be correlated to other important activities, such as anti-inflammatory activity. Studies have shown that reactive substances (EROs and ERNs) may be closely involved in the pathogenesis of inflammatory processes and that may exacerbate tissue damage.<sup>[27]</sup> Different models can be used to study the various events occurring in the development of the inflammation process, signs and symptoms such as heat, flushing, tumor, edema and pain. Among these, carrageenan- induced paw edema presents several advantages to study inflammation.

The systemic anti-inflammatory effects of the MEPC and alkaloid isolated (PC-1) in acute inflammation was evaluated by induction of a carrageenan-induced paw edema model during 0.5, 1, 2 and 4 h after carrageenan administration (Figure 2). This is a classic test to evaluate acute inflammation, with multiple mediators acting in sequence to produce an inflammatory response, being in the early phase (0–1 h) the release of histamine, serotonin and bradykinin occurs, and in the later stage (1–6 h) with an increased production of prostaglandins, COX-2 activation and NO release.<sup>[28,39]</sup>

The level of inhibition was of  $55.32 \pm 7\%$  (300 and 100 mg/kg, MEPC),  $34.04 \pm 4\%$  (50 mg/kg, EMPC),  $59.57 \pm 7\%$  (50 mg/kg, PC-1) and  $51.06 \pm 6\%$  (10 mg/kg, PC-1), at 2h (Figure 2C). For 4h, the EMPC (300, 100 and 50 mg/kg) and PC-1 (50 and 10 mg/kg), showed inhibitions of  $57.77 \pm 8\%$ ,  $46.66 \pm 7\%$ ,  $46.68 \pm 5\%$ ,  $62.20 \pm 3\%$  and  $42.22 \pm 4\%$ , respectively, (Figure 2D). The positive control (DEX) showed a significant reduction at all time points, with same inhibition of  $42 \pm 5\%$  at 0.5 h,  $56 \pm 9\%$  at 1 h,  $74 \pm 5\%$  at 2 h and  $77 \pm 8\%$  at 4 h (Figure 3). This study, it can be seen that MEPC and PC-1 there was a significant decrease in swelling after 2 h from the time of administration when compared with the control group, acting mainly on the later phase of the carrageenan induced inflammatory response, probably because of a reduction in local vascular permeability. Thus, we concluded that *P. crocea* promotes a reduction in cell leakage, leading to the consequent reduction of proinflammatory mediators, which provides support to the traditional use of this plant for the treatment of edema processes.



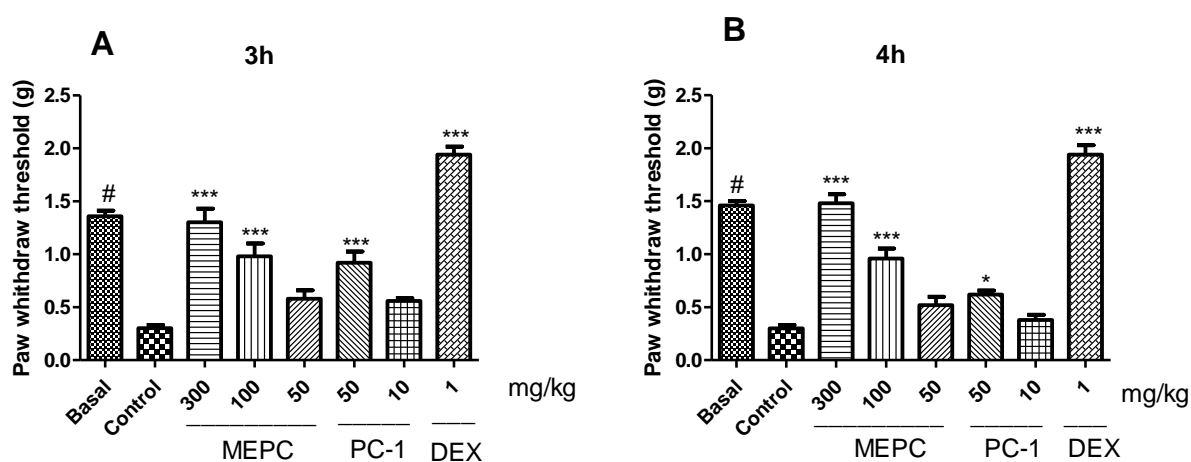
**Figure 3** Effect of oral administration of MEPC and PC-1 on the carrageenan-induced paw edema in mice. The animals received MEPC (300, 100 or 50 mg/kg, p.o.), PC-1 (50 or 10 mg/kg, p.o.), vehicle (control) or dexamethasone (DEX, 1 mg/kg, s.c.), and 1 h later, an intraplantar injection of carrageenan (300 µg/paw) was administered. Graphs represent the evaluation of the paw edema at 0.5, 1, 2, and 4 h, respectively, after carrageenan injection. Each bar represents the mean  $\pm$  SEM of 6 animals. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  compared with the control group. One-way ANOVA followed by the Newman-Keuls posttest.

The increase in the pain sensitivity is a common characteristic of the inflammatory response that involves a reduction in nerve fiber activation that is induced by mechanical stimuli, as well as the development of other parameters related to arthritis, such as knee edema. These mediators are involved in the inflammatory sensitization to mechanical and heat stimuli as COX2, TNF- $\alpha$ , and IL-1 $\beta$  play a role in the induction of hyperalgesia.<sup>[28,29]</sup> The oral administration of MEPC (300 mg/kg) reduced the mechanical hyperalgesia in

the carrageenan treated animals by 100% at 3 and 4 h after injection, similar to observed following treatment with DEX (positive control) (Figure 3). The dose of 100 mg/kg also showed significant efficacy in reduction of mechanical sensitivity in mice, by 68% (3 h) (Figure 3A) and 62% (4 h) (Figure 3B). The compound PC-1 only in dose 50 mg/kg showed reduced by 62% and 32% at 3 and 4 h after injection (Figure 3A, B).

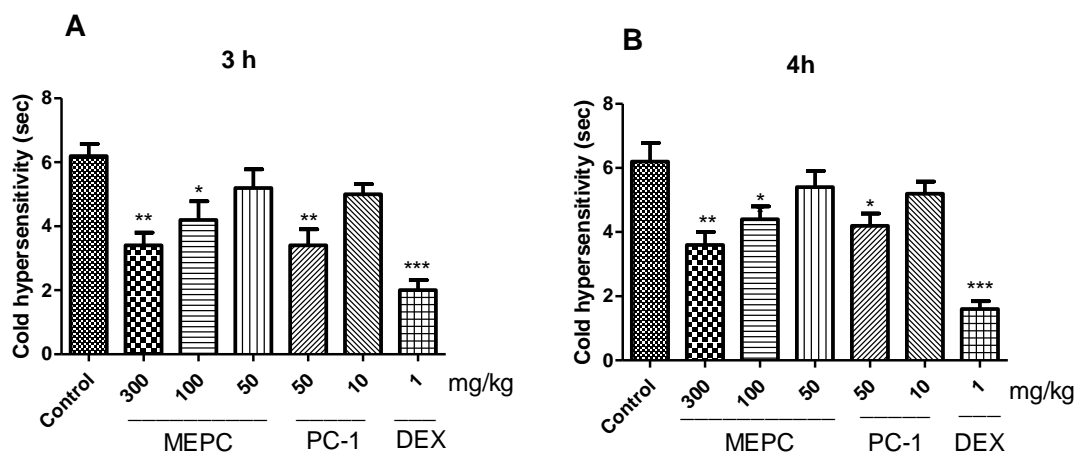
The cold sensitivity reaction was observed during 30 s, by paw licking, shaking or rubbing, showed a maximum inhibition of  $45 \pm 3\%$  and  $42 \pm 4\%$  for MEPC (300 mg/kg) at 3 and 4 h, respectively and for PC-1 (50 mg/kg) of  $45 \pm 3\%$  at 3 h, after carrageenan injection (Figure 4A, B). The MEPC in dose of 100 mg/kg (3 and 4 h) and PC-1 in dose of 50 mg/kg (4 h) also reduced significantly the cold response to acetone in mice, showed inhibition  $\geq 32\%$  (Figure 5A, B). *P. crocea* showed anti-hyperalgesic properties in which it inhibited mechanical hyperalgesia and cold sensitivity.

Pharmacological studies performed in animal model, by one of the already reported compounds of *P. crocea*, psychollatine demonstrated analgesic effects against algogenic stimuli, [40] anxiolytic, antidepressant and amnesic. By this study, psychollatine is able to modulate system of different neurotransmitters, including NMDA, opioid and 5-HT<sub>2A/C</sub> receptors. [41,42] *In vitro* studies conducted by Passos *et al.*, [43] report that this compound was able to inhibit the activity of butyrylcholinesterase in range of 72.5% to  $10^{-4}$  M.



**Figure 4** Effect of oral administration of MEPC (300, 100 or 50 mg/kg, p.o.), PC-1 (50 or 10 mg/kg, p.o.), on the mechanical hyperalgesia in mice. The animals received vehicle (control) or dexamethasone (DEX, 1 mg/kg, s.c.). In A the mechanical hyperalgesia was measured with a digital analgesymeter 3 and in B for 4 h after carrageenan administration.

Each bar represents the mean  $\pm$  SEM of 6 animals. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ , # $p < 0.001$  when compared with the control group. One-way ANOVA followed by the Newman-Keuls test.



**Figure 5** Effect of oral administration of MEPC on the cold sensitivity induced by acetone in mice. The animals received MEPC (300, 100 or 50 mg/kg), PC-1 (50 or 10 mg/kg), control or dexamethasone (DEX, 1 mg/kg, s.c.). In A the cold sensitivity was measured 3 h and in B 4 h after carrageenan administration. Each bar represents the mean  $\pm$  SEM of 6 animals. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  when compared with the control group. One-way ANOVA followed by the Newman-Keuls post test.

## Conclusions

To the best of our knowledge, this is the first evaluation of the biological activities of the plant *P. crocea*, demonstrating their potential as antioxidant, anti-edematogenic and anti-hyperalgesic, corroborating with popular use as a natural anti-edematogenic agent in Mato Grosso. This effect can be attributed to the presence in part of phenolic compounds and monoterpenoid indole alkaloid croceaine A. Additional studies are needed to elucidate the mechanism of action responsible for this activity.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Authors' contributions

PCOJ, ASNF and MHS designed the study, performed the extraction/fractionation of the extract, performed the isolation/structure elucidation of the alkaloid, determined the levels of total phenols, flavonoids and flavonol, assessed the antioxidant activity and helped in manuscript writing and editing. CALK, participated in the anti-inflammatory assays. CALC in HPLC analysis. ZVP participated in the collection of plant material. All authors read and approved the final manuscript.

## Acknowledgements

We are grateful to CAPES and CNPq for fellowships for financial support.

## References

1. Taylor CM. Conspectus of the genus *Palicourea* (Rubiaceae: Psychotrieae) with the description of some new species from Ecuador and Colombia. *Ann Mo Bot Gard* 1997; 84: 224–262.
2. Hartwell Jr JL. Plants used against cancer: a survey. *Lloydia* 1971; 34: 103–160.
3. Gorniak S.L., et al. *Palicourea marcgravii* intoxication in rats: effects of different fractions. *Veterinarian Human Toxicology* 1992; 34-3: 216–218.
4. Tokarnia CH et al. Plantas tóxicas do Brasil. Rio de Janeiro: Ed. *Helianthus* 2000; 310p.
5. Kemmerling W. Toxicity of *Palicourea marcgravii*: combined effects of fluoroacetate, N-methyltyramine and 2-methyltetrahydro-beta-carboline. *Zeitschrift für Naturforschung C. J Biosci* 1996; 51: 59–64.

6. Oliveira MM Chromatographic isolation of monofluoroacetic acid from *Palicourea marcgravii* St. Hil. *Experientia* 1963; 19: 586-587.
7. Moraes-Moreau RL *et al.* Chemical and biological demonstration of the presence of mono-fluoroacetate in the leaves of *Palicourea marcgravii* St. Hil. *Braz J Med Biol Res* 1995; 28: 685-692.
8. Lee ST *et al.* Detection of monofluoroacetate in *Palicourea* and *Amorimia* species. *Toxicol* 2012; 60: 791-796.
9. Andrade SO, Matos Jr. Contribuição do estudo de plantas tóxicas no Estado de São Paulo. *Instituto Biológico* 1968; 63–66.
10. Peixoto PV *et al.* Intoxicação experimental por *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae) em coelhos. *Pesq Vet Bras* 1987; 7: 117–129.
11. Pereira ZV *et al.* Morfoanatomia foliar de *Palicourea longepedunculata* Gardiner (Rubiaceae). *Revista Árvore* 2003;27: 759-767.
12. Tokarnia CH *et al.* Plantas Tóxicas da Amazônia a Bovinos e outros Herbívoros. Manaus: *INPA*, 1979; 95p.
13. Afonso E, Pott A. [*Palicourea*] Plantas no Pantanal Tóxicas para Bovinos. *Embrapa Informação Tecnológica*. 2001; 51p.
14. Ribeiro RV *et al.* Ethnobotanical study of medicinal plants used by Ribeirinhos in the North Araguaia microregion, Mato Grosso, Brazil. *J Ethnopharmacol* 2017; 9: 69-102.
15. Düsman LT *et al.* Monoterpene Indole Alkaloids from *Palicourea crocea*. *J Nat Prod* 2004; 67: 1886-1888.
16. Narine LL, Maxwell AR. Monoterpenoid indole alkaloids from *Palicourea crocea*. *Phytochem Lett* 2009; 2: 34-36.
17. Berger A *et al.* Loganin and secologanin derived tryptamine–iridoid alkaloids from *Palicourea crocea* and *Palicourea padifolia* (Rubiaceae). *Phytochemistry* 2015; 116: 162-169
18. Formagio ASN *et al.* Allelopathic and antioxidant potential of plants extracts. *J Biosci* 2014; 30: 629-638.



19. Zanella CS *et al.* Atividade de óleos e extratos vegetais sobre germinação carpogênica e crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum*. *Arq Inst Biol* 2015; 82: 1-8.
20. Stocks J *et al.* Assay using brain homogenate for measuring the antioxidant activity of biological fluids. *Clin Sci Mol Med* 1974; 47: 215-222.
21. Valverde J *et al.*  $\beta$ -Carboline monoterpene glucosides from *Palicourea adusta*. *Phytochemistry* 1999; 52: 1485–1489.
22. Do Nascimento CA *et al.* Alkaloides from *Palicourea coriacea* (Cham.) K. Schum. *Zeitschrift für Naturforschung. B, A Journal of Chemical Sciences* 2006; 61: 1443-1446.
23. Do Nascimento CA *et al.* A tetrahydro-b-carboline trisaccharide from *Palicourea coriacea* (Cham.) K. Schum. *Carbohydr Res* 2008; 343: 1104–1107.
24. Kerber VA *et al.* Three new monoterpene indole alkaloids from *Psychotria umbellata* Thonn. *Tetrahedron Lett* 2014; 55: 4798-4800.
25. Bruneton J. Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia. AS/Espanha: Ed. Acribia 1991; 594p.
26. Seyoum A *et al.* Structure–radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry* 2006; 67: 2058-2070.
27. Hensley K *et al.* Reactive oxygen species, cell signaling and cell injury. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 1456-1462.
28. Zhang JM, An J. Cytokines, inflammation and pain. *Int Anesthesiol Clin* 2007; 45: 27.
29. Decosterd I, Woolf CJ. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain* 2000; 87: 149-58.
30. Winter CA *et al.* Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med* 1962; 111: 544-7.
31. Chaplan SR *et al.* Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods* 1994; 53: 55–63.

32. Gullón B *et al.* Rutin: A review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability. *Trends Food Sci Technol* 2017; 67: 220-235.
33. Sharma S *et al.* Rutin: therapeutic potential and recent advances in drug delivery. *Expert Opin Investig Drugs* 2013; 22: 1063-1079.
34. Manach C *et al.* Bioavailability of rutin and quercetin in rats. *FEBS Letters* 1997; 409: 12-16.
35. Srinivasan M *et al.* Ferulic Acid: Therapeutic potential through its antioxidant property. *J Clin Biochem Nutr* 2007; 40: 92-100.
36. Touaibia M *et al.* Caffeic Acid, a versatile pharmacophore: an overview. *Mini Rev Med Chem*. 2011; 8: 695-713
37. Ilhami G. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology* 2006; 217:213-20.
38. Di Rosa M *et al.* Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *J Pathol* 1971; 104: 15–44.
39. De Oliveira CM *et al.* Antinociceptive properties of bergenin. *J Nat Prod* 2011; 74, 2062–2068.
40. Both FL *et al.* Analgesic properties of umbellatine from *Psychotria umbellata*. *Pharm Biol* 2002; 40, 336-341.
41. Both FL *et al.* Psychopharmacological profile of the alkaloid psychollatine as a 5HT<sub>2A/C</sub> serotoninina modulator. *J Nat Prod* 2005; 68, 374-380.
42. Both FL *et al.* Role of glutamate and dopamine receptors in the psychopharmacological profile of the índole alkaloid psychollatine. *J Nat Prod* 2006; 69, 342-345.
43. Passos CS *et al.* Indole alkaloids of *Psychotria* as multifunctional cholinesterase and monoamine oxidases inhibitors. *Phytochemistry* 2013; 86, 8.

## 5. Referencias

Abbas, A., K.; Fausto, N.; Kumar, V.; Cotran, R., S.; Aster, J. C.; Robbins, S., L.: Robbins e Cotran: Patologia - Bases patológicas das doenças. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 1458 p. 2010.

Andrade, S.,O.; Matos, Jr. Contribuição do estudo de plantas tóxicas no Estado de São Paulo. Instituto Biológico. p. 63–66.1968.

Alves, V. G.; da Rosa, E. A.; de Arruda, L.L.; Rocha, B. A.; Amado, C. A. B.; Santin, S. M.; Pomini, A. M.; da Silva, C. C. Acute toxicity, antiedematogenic activity, and chemical constituents of *Palicourea rigida* Kunth. **Zeitschrift Für Naturforschung C**, [s.l.], v. 71, n. 3-4, p.1-5, 1 jan. 2016.

Ashley, N., T.; Weil, Z., M.; Nelson, R., J. Inflammation: Mechanisms, costs, and natural variation. **Annu Review Ecology, Evolution, and Systematics**. 43:385-406. 2012

Barreiros, A., L., B., S.; David, J., M.; David, J., P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quimica Nova**, Salvador, v. 29, n. 1, p.113-126, 2006.

Berger, A.; Kostyan, M., K.; Klose, S., I. Loganin and secologanin derived tryptamine–iridoid alkaloids from *Palicourea crocea* and *Palicourea padifolia* (Rubiaceae). **Phytochemistry**, [s.l.], v. 116, p.162-169, ago. 2015.

Bertelli, P., R.; Biegelmeyer, R.; Rico, E., P.; Klein-Junior, L., C.; Toson, N., S., B.; Minetto L.; Bordignon, S., A., L.; Gasper, A., L.; Moura, S.; de Oliveira, D., L.; Henriques, A., T. Toxicological profile and acetylcholinesterase inhibitory potential of *Palicourea deflexa*, a source of  $\beta$ -carboline alkaloids. **Comparative Biochemistry And Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, [s.l.], v. 201, p.44-50, out. 2017.

Bokesh, H., R.; Pannell, L., K.; Cochran, P., K.; Sowder, R., C.; Mckee, T., C.; Boyd, M., R.; A novel anti-HIV macrocyclic peptide from *Palicourea condensata*. **Journal of Natural Products** 64, 249–250. 2001.

Bolzani, V., S.; Trevisan, L., M., V.; Young, M., C.; Triterpenes of *Palicourea rigida* H.B.K. **Revista Latinoamericana Quimica**. 23, 20–21. 1992.

BFG. Brazilian Flora Group. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. *Rodriguésia*. 66(4):1085-113. 2015.

Coelho, E., G.; Amaral, A., C., F.; Ferreira, J., L., P.; dos Santos, A., G.; Pinheiro, M., L., B.; SILVA, J., R., D., A. Calcium oxalate crystals and methyl salicylate as toxic principles of the fresh leaves from *Palicourea longiflora*, an endemic species in the Amazonas state. **Toxicon**, 49(3), 407-409, 2007.

Cordell, G., A.; Saxton, J., E. Bisindole Alkaloids, in *The Alkaloids*. Vol.20. (Manske, R. H. F.; Rodrigo, R. G. A.), 3-296. Academic Press. New York. 1981.

Cruvinel, W., M.; Júnior, D., M.; Araújo, J., A., P.; Tieko, T.; Catelan, T.; Souza, A., W., S.; da Silva, N., P.; Andrade, L., E., C. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, [s.l.], v. 50, n. 4, p.434-447, ago. 2010.

da Silva, V., C.; de Carvalho, M., C.; Nogueira, A., A. Chemical constituents from leaves of *Palicourea coriacea*. **Journal of Natural Medicine**. 62 (3), 356–357. 2008.

do Nascimento, C., A.; Gomes, M., S.; Liao, L., M.; de Oliveira, C., M.; Kato, L.; da Silva, C., C.; Tanaka, C., M. Alkaloids from *Palicourea coriacea* (Cham.) K. Schum. **Zeitschrift für Naturforschung B**, 61(11), 1443, 2006.

do Nascimento, C., A.; Liao, L., M.; Kato, L.; da Silva, C., C.; Tanaka, C., M., A.; Schuquel, I., T., A.; de Oliveira, C., M., A.; Kato, I. A tetrahydro-b-carboline

trisaccharide from *Palicourea coriacea* (Cham.) K. Schum. **Carbohydrate Research** 343, 1104–1107. 2008.

Düsman, L., T.; Jorge, T., C., M.; Souza, M., C., de. Monoterpene Indole Alkaloids from *Palicourea crocea*. **Journal of Natural Products** [s.l.], v. 67, n. 11, p.1886-1888, nov. 2004.

El-Seedi, H., R. Coumarins, benzoic acids and triterpenoids from *Palicourea demissa*. **Revista Latinoamericana Quimica**. 27, 13–16. 1999.

Francis, J., K., fs.fed.usda. United States Department of Agriculture. 2004 disponível em: <[www.fs.fed.us/global/iitf/wildlands\\_shrubs.htm](http://www.fs.fed.us/global/iitf/wildlands_shrubs.htm)> acesso em: 01/12/2017.

Freitas, P., C., M.; Pucci, L., L.; Vieira, M., S.; Lino, R., S.; Oliveira, C., M., A.; Cunha, L., C.; Paula, J., R.; Valadares, M., C. Diuretic activity and acute oral toxicity of *Palicourea coriacea* (Cham.) K Schum. **Journal of ethnopharmacology**, 134(2), 501-503, 2011.

Formagio, A., S., N.; Masetto, T., E.; Vieira, M., C.; Zárata, N., A., H.; MATOS, A., I.; Volobuff, C., R., F. Allelopathic and antioxidant potential of plants extracts. **Bioscience Journal**, Uberlandia, v. 30, n. 2, p.629-638, out. 2014.

de Garcia, L., A.; Tobon, C., F.; Mora, C., E. Cytotoxicity of the constituents of *Palicourea ovalis*. **Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas**, 26, 55–57, 1997.

Gonzaga, A., D.; Garcia, M., V., B.; de Sousa, S., G., A.; PY-Daniel, V.; Correa, R., D., S.; Ribeiro, J., D. Toxicidade de manipueira de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e erva-de-rato (*Palicourea margravii* St Hil) a adultos de *Toxoptera citricida* Kirkaldy (Homoptera: Aphididae). **Acta Amazonica**, 38, 101–106, 2008.

González, P.; Mauriz, J., L.; González-Gallego, J. Shock Hemorrágico y Radicales Libres: Papel Protector de la Glicina. In: Estresse Oxidativo e Antioxidantes. Porto Alegre: Editora Ulbra., p.63-78. 2002

Górniak, S., L.; Palermo-Neto, J.; de Souza-Spinosa, H. Effects of a *Palicourea marcgravii* leaf extract on some dopamine-related behaviours of rats. **Journal of Ethnopharmacology**. 28, 329–335. 1992.

Górniak S., L.; Souza-Spinosa, H.; Palermo-Neto J.; Ferro, V., O.; Oliveira, F. Chromatographic isolation of caffeine from *Palicourea marcgravii*. **Veterinary and Human Toxicology**, 28(6), 542, 1986.

Hartwell Jr., J., L. Plants used against cancer: a survey. **Lloydia** 34, 103–160. 1971.

Kemmerling, W. Toxicity of *Palicourea marcgravii*: combined effects of fluoroacetate, N-methyltyramine and 2-methyltetrahydro-beta-carboline. **Zeitschrift für Naturforschung C**, 51(1-2), 59-64, 1996.

Lee, S., T.; Cook, D.; Riet-Correa, F.; Pfister, J., A.; Anderson, W., R.; Lima, F., G.; Gardner, D., R. Detection of monofluoroacetate in *Palicourea* and *Amorimia* species. **Toxicon** 60:791-796. 2012

Lobo, V.; Patil, A.; Phatak, A.; Chandra, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy Reviews**, [s.l.], v. 4, n. 8, p.118-118, 2010.

Lopes, S.; von Poser, G., L.; Kerber, V., A.; Farias, F., M.; Konrath, E., L.; Moreno, P.; Sobral, M., E.; Zuanazzi, J., A., S.; Henriques, A., T. Taxonomic significance of alkaloids and iridoid glucosides in the tribe Psychotrieae (Rubiaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, 32, 1187-1195, 2004.

Melo, J., G.; Santos, A., G.; de Amorim, E., L.; do Nascimento, S., C.; de Albuquerque, U. P.; Medicinal plants used as antitumor agents in Brazil: an ethnobotanical approach. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 365-359, 2011.

Maskrey, B., H.; Megson, I., L.; Whitfield, P., D.; Rossi, A., G. Mechanisms of resolution of inflammation: a focus on cardiovascular disease. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**;31:1001–1006. 2011

Mesquita, Jr., D.; Araújo, J., A., P.; Catelan T., T., T.; de Souza, A., W., S.; da Silva, N., P.; Andrade, L., C., E.; Cruvinel, W., N. Aspectos celulares e moleculares da inflamação. Disponível em: <[http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?fase=r003&id\\_materia=4053](http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?fase=r003&id_materia=4053)> Acesso em: 20 Nov. 2017.

Moraes-Moreau, R., L; Haraguchi, M.; Morita, H.; Palermo, N., J. Chemical and biological demonstration of the presence of mono-fluoroacetate in the leaves of *Palicourea marcgravii* St. Hil. **Brazilian Journal Med. Biol. Res.** 28:685-692. 1995.

Morel, L., J., F.; Baratto, D., M.; Pereira, P., S.; Contini, S., H., T.; Momm, H., G.; Bertoni, B., W.; Franco, S., de C.; Pereira, A., M., S. Loganin production in *Palicourea rigida* HBK (Rubiaceae) from populations native to Brazilian Cerrado. **Journal of Medicinal Plants Research**, 5(12), 2559-2565, 2011.

Morita, H.; Ichihara, Y.; Takeya, K.; Watanabe, K.; Itokawa, H.; Motidome, M. A new indole alkaloid glycoside from the leaves of *Palicourea marcgravii*. **Planta medica**, 55(03), 288-289, 1989.

Nakano, T.; Martín, A. Studies on the alkaloids of *Palicourea fendleri*. **Planta medica**, 30(06), 186-188, 1976.

Narine, L., L.; Maxwell, A., R. Monoterpenoid indole alkaloids from *Palicourea crocea*. **Phytochemistry Letters**, [s.l.], v. 2, n. 1, p.34-36, fev. 2009.

Oliveira, M., M. Chromatographic isolation of monofluoroacetic acid from *Palicourea marcgravii* St. Hil. **Experientia** 19 (11):586-587. 1963.

OMS, Bulletin of the World Health Organization. Regulatory situation of herbal medicines. A worldwide review, Geneva, 1998.

Passos, D., C.; Ferreira, H., D.; Vieira, I., L., F., B.; Nunes, W., B.; Felício, L., P.; Silva, E., M.; Vale, C., R.; Duarte, S., R.; Silva, E., S.; Carvalho, S., Modulatory effect of

*Palicourea coriacea* (Rubiaceae) against damage induced by doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Genetics and Molecular Research**, 9, 1153-1162, 2010.

Peixoto, P., V.; Döbereiner, J.; Tokarnia, C., H.; Peixoto, C., S. Intoxicação experimental por *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae) em coelhos. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 7(4):117-129. 1987.

Pereira, Z., V.; Meira R., M., S., A.; Azevedo, A., A. Morfoanatomia foliar de *Palicourea longepedunculata* Gardiner (Rubiaceae). **Revista Árvore** 27: 759-767. 2003.

.Pinheiro, R., P.; Moraes, M., A.; Santos, B., C., S.; Fabri, R., L.; Del-Vechio, V.; Yamamoto, C., H.; Araújo, A., L., A.; Sousa, O., V. Identification of compounds from *Palicourea rigida* leaves with topical anti-inflammatory potential using experimental models. **Inflammopharmacology**, [s.l.], p.1-12, 14 nov. 2017.

Pinto, M., F.; Fensterseifer, I., C.; Migliolo, L.; Sousa, D., A.; de Capdville, G.; Arboleda-Valencia, J., W.; Colgrave, M., L.; Craik, D., J.; Magalhães, B., S.; Dias, S., C.; Franco, O., L. Identification and structural characterization of novel cyclotide with activity against an insect pest of sugar cane. **Journal of Biological Chemistry**, 287(1), 134-147, 2012.

Ripperger, R. Chimonanthine from *Palicourea dominguensis*. **Pharmazie** 37, 867. 1982.

Rock, K., L.; Kono, H. The Inflammatory Response to Cell Death. **Annual Review Of Pathology: Mechanisms of Disease**, [s.l.], v. 3, n. 1, p.99-126, fev. 2008.

Rosa, E., A.; Silva, B., C.; Silva, F., M.; Tanaka, C., M., A.; Peralta, R., M.; Oliveira, C., M., A.; Kato, L.; Ferreira, H., D.; Silva, C., C. 158 Flavonoides e atividade antioxidante em *Palicourea rigida* Kunth, Rubiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 20(4), 484-488, 2010.

Seleem, D.; Pardi, V.; Murata, R., M. Review of flavonoids: A diverse group of natural compounds with anti-*Candida albicans* activity in vitro. **Archives Of Oral Biology**, [s.l.], v. 76, p.76-83. 2017.



Silva, L., M.; Lima, V.; Holanda, M., L.; Pinheiro, P., G.; Rodrigues, J., A.; Lima, M., E.; Benevides, N., M. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of lectin from marine red alga *Pterocladia capillacea*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, n. 5, p. 830-835, 2010.

Silva, W., C.; Martins, J., R., S.; Cesio, M., V.; Azevedo, J., L.; Heinzen, H.; de Barros, N., M. Acaricidal activity of *Palicourea marcgravii*, a species from the Amazon forest, on cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary parasitology**, 179(1), 189-194, 2011.

Soares, P., R., O.; Oliveira, P., L.; Oliveira, C., M., A.; Kato, L.; Guillo, L., A. In vitro antiproliferative effects of the indole alkaloid vallesiachotamine on human melanoma cells. **Archives of Pharmacal Research**, 35(3), 565-571, 2012.

Stuart, K., L.; Woo-Ming, R., B. *Palicourea* alkaloids: The structure of palinine. **Tetrahedron letters**, 15(44), 3853-3856, 1974.

Stuart, K., L.; Woo-Ming, R., B. Vomifoliol in *Croton* and *Palicourea* species. **Phytochemistry**, 14(2), 594-595, 1975.

Tabas, I.; Glass, C., K. Anti-Inflammatory Therapy in Chronic Disease: Challenges and Opportunities. **Science**, [s.l.], v. 339, n. 6116, p.166-172, 10 jan. 2013.

Tokarnia, C., H.; Dobereiner, J.; Peixoto, P., V. Plantas Toxicas do Brasil. **Hellianthus**, Rio de Janeiro, pp. 3–17. 2000.

Turolla, M., S., dos R.; Nascimento, E., de S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 2, 2006.

Valverde, J.; Tamayo, G.; Hesse, M. b-Carboline monoterpene glucosides from *Palicourea adusta*. **Phytochemistry** 52, 1485–1489. 1999.

Veiga Junior, V., F.; Pinto, A., C.; Maciel, M., A., M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, p. 519-528, 2005.

Woo-Ming, R., B.; Stuart, K., L. Calycanthine from *Palicourea alpina*. **Phytochemistry**, 14(11), 2529, 1975.

Zanella, C., de S.; Gavassoni, W., L.; Bacchi, L., M., A. Atividade de óleos e extratos vegetais sobre germinação carpogênica e crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Arquivos do Instituto Biológico**, [s.l.], v. 82, p.1-8, 2015.

## 6. Anexos

### 6.1 Aprovação do projeto pelo comite de ética em uso animal



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, 8 de setembro de 2017.

#### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "*Palicourea crocea* (SW.) SCHULT. (Rubiaceae): **atividade biológica e isolamento de alcaloides**", registrada sob o protocolo de nº 17/2017, sob a responsabilidade de *Anelise Samara Nazari Formagio e Pedro Cruz de Oliveira Junior* – 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 aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFGD) da Universidade Federal da Grande Dourados, em reunião de 23/06/2017.

Finalidade	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	30/09/2017 a 20/03/2018
Espécie/linhagem/raça	<i>Rattus norvegicus</i> /Wistar e <i>Mus musculus</i> /Swiss
Nº de animais	191/ 113 Wistar e 78 Swiss
Peso/idade	45 dias
Sexo	113 machos Wistar 36 machos e 42 fêmeas Swiss
Origem	Biotério Central da UFGD

Melissa Negrão Sepulveda  
Coordenadora CEUA

