

LYVIA GUARIZE NOGUEIRA

SENNA MACRANTHERA: CONSTITUIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Genética e Biotecnologia.

Orientador(a): Dra.Elita Scio Fontes

Juiz de Fora / 2009

LYVIA GUARIZE NOGUEIRA

SENNA MACRANTHERA: CONSTITUIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Termo de aprovação

Trabalho apresentado para obtenção do título de Mestre do Programa de Pós-Graduação de Ciências Biológicas – área de atuação: Genética e Biotecnologia da Universidade Federal de Juiz de Fora

Orientadora: Elita Scio Fontes
Departamento de Bioquímica-UFJF

Banca examinadora:

Dr. Daniel Sales Pimenta
Departamento de Botânica - UFJF

Dra Luciana Moreira Chedier
Universidade Presidente Antônio Carlos/JF

Juiz de Fora / 2009

Dedico esse trabalho aos meus pais Adão e Heloisa pelo esforço e apoio; às minhas irmãs Aline e Thais pela confiança e paciência; aos parentes pelo incentivo e a todos os amigos pela presença constante em minhas decisões.

Agradecimentos

Em primeiro lugar ao meu amado Deus, que me deu força e esperança nos momentos mais difíceis da minha caminhada;

Meu sincero agradecimento aos meus pais pelo constante amor, incentivo e carinho, por serem meu porto seguro, e por jamais me desampararem;

Às minhas irmãs queridas, por me estenderam as mãos tanto nos momentos de dificuldades, quanto nas vitórias;

A todos os familiares que sempre estiveram do meu lado incentivando-me e me fazendo acreditar no meu potencial;

À Dra e orientadora Elita Scio Fontes pela paciência, apoio, amizade e pelo seu carinho, que sempre me fez sentir uma vencedora;

Aos amigos Rodrigo Luis Fabri, Danielle Maria de Oliveira Aragão, Maria Lúcia Morcerf Bouzada e Juliana Lanini que estiveram comigo desde o início e conhecem todos os desafios enfrentados durante essa caminhada;

À UFJF, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas pelo apoio técnico-científico.

Ao Departamento de Bioquímica da UFJF, pelas valiosas contribuições e demonstrações de amizade que me permitiram concluir meu trabalho com serenidade;

À Dra. Elaine Soares Coimbra pela contribuição e sugestão nas dificuldades técnicas encontradas;

Aos professores que compuseram a Banca Examinadora, Dr. Daniel Sales Pimenta e Dra Luciana Moreira Chedier.

Aos colegas de Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais pelos bons momentos de convivência.

*“ A coisa mais bela que podemos experimentar é
o mistério.*

Essa é a fonte de toda arte e ciência verdadeira.

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

Albert Einstein

RESUMO:

Várias espécies de *Senna* são bastante conhecidas por suas propriedades terapêuticas, sendo utilizadas na medicina popular para o tratamento de inflamação na garganta e constipação. Neste estudo, foram avaliadas algumas propriedades biológicas e farmacológicas das folhas de *Senna macranthera* como as atividades anti-inflamatória, laxativa, sobre motilidade intestinal, antimicrobiana e antioxidante. A triagem fitoquímica do seu extrato metanólico e partições permitiu a identificação de compostos fenólicos como flavonoides, taninos e cumarinas na maioria das amostras, com exceção da partição em hexano, que apresentou antronas, triterpenos e esteroides em sua composição. O perfil cromatográfico obtido por CLAE mostrou a presença da antraquinona emodina em todas as amostras. A partição em hexano reduziu significativamente o edema de pata induzido pela carragenina em ratos, de maneira similar ao diclofenaco de sódio. Atividade laxativa comparável ao padrão bisacodil foi observada para o extrato em metanol e partição em hexano, porém somente o último aumentou a motilidade intestinal. Além disso, o extrato metanólico e partições foram avaliados quanto a sua atividade antioxidante e a partição em acetato de etila apresentou pronunciada atividade, comparável ao padrão rutina. Significativa atividade antibacteriana sobre *Pseudomonas aeruginosa* também foi encontrada para o extrato em metanol e partição em hexano. Não foi observada citotoxicidade para *Artemia salina* ou espécies de *Leishmania* para nenhuma amostra.

Palavras-chave: *Senna macranthera*; laxativo; anti-inflamatório; motilidade intestinal; antioxidante; antimicrobiano.

ABSTRACT

Several species of *Senna* are well known for their therapeutic properties, being used in the folk medicine to treat throat inflammation and constipation. In this study, an attempt was made to evaluate some biological and pharmacological properties of *Senna macranthera* leaves. In this regard, the anti-inflammatory, the laxative and the intestinal motility effects, and also the antimicrobial and antioxidant activities of its methanolic extract and partitions were determined. The phytochemical screening allowed the identification of phenolic compounds like flavonoids, tannins and coumarins in the majority of the extracts except for the hexane one which presented anthrones, triterpenes and steroids in its composition. The HPLC profile showed the presence of the anthraquinone emodine in all samples. The hexane partition significantly reduced carrageenan-induced paw edema in rats in a manner similar to that of sodium diclofenac. Laxative effect was observed for the methanolic extract and hexane partition comparative to the standard drug bisacodyl, however only the later increased the intestinal motility. Moreover, the samples were evaluated for their antioxidant activity and ethyl acetate partition presented a pronounced activity comparable to the standard rutin. Antibacterial activity against *Pseudomonas aeruginosa* was also found for methanolic extract and hexane partition. No cytotoxicity against *Artemia salina* and *Leishmania* species were detected for any extracts.

Key words: *Senna macranthera*; laxative; anti-inflammatory; intestinal motility; antioxidant; antimicrobial.

LISTA DE DESENHOS

Desenho 1: Estrutura química do anel antracênico.....	21
Desenho 2: Reações de redução e oxidação no grupo antracênico.....	22
Desenho 3: Rotas biossintéticas de compostos antracênicos.....	23
Desenho 4: Estrutura química dos senosídeo A, senosídeo B, senosídeo C e senosídeo D.....	26
Desenho 5: Estrutura química do ácido salicílico extraído de <i>Salix Alba</i>	30
Desenho 6: Reações que ocorrem durante o processo de peroxidação lipídica de um ácido graxo poli-insaturado.....	36
Desenho 7: Núcleo fundamental do flavonoide.....	37
Desenho 8: Estruturas químicas dos principais isoflavonoides da soja.....	38
Desenho 9: Esquema do procedimento de preparo do extrato metanólico das folhas de <i>S. macranthera</i>	43
Desenho 10: Esquema do particionamento líquido-líquido do extrato metanólico de <i>S. macranthera</i> utilizando solventes de polaridades diferentes.....	44
Desenho 11: Esquema do procedimento para identificação de compostos antracênico nas folhas de <i>S. macranthera</i> e sene comercial.....	48
Desenho 12: Esquema do procedimento de extração ácido-base de alcaloides nas folhas de <i>S. macranthera</i>	49
Desenho 13: Cromatograma substância de referência emodina com tempo de retenção 2,7min. No detalhe o espectro U.V da emodina.....	61
Desenho 14: Cromatogramas obtidos por CLAE mostrando a presença de emodina (TR = 2,7 min) nas diversas amostras. Detecção em 270nm.....	62

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fotografia 1: <i>Senna macranthera</i> (Collad.) H. S. Irwin & Barneby. Detalhes do habitat, inflorescência, fruto e sementes.....	25
Fotografia 2: <i>Artemia salina</i> utilizada para os ensaios de toxicidade.....	39
Fotografia 3: Forma promastigota, flagelada de leishmania.....	40
Fotografia 4: Forma amastigota, aflagelada de leishmania.....	40
Gráfico 1: Efeito laxativo do extrato metanólico e partições de <i>S. macranthera</i> , durante período de 8 horas após administração das amostras em ratos Wistar albinos.....	66
Gráfico 2: Efeito laxativo do extrato metanólico e partições de <i>S. macranthera</i> , durante período de 16 horas após administração das amostras em ratos Wistar albinos e com livre acesso à comida e água.....	67
Gráfico 3: Distância percorrida pelo marcador (carvão) no intestino delgado de ratos nos diversos grupos experimentais.....	68
Gráfico 4: Efeito do extrato metanólico e partição em hexano de <i>S. macranthera</i> (400 mg/kg/v.o) sobre o edema de pata induzido por carragenina durante 4 horas de experimento.....	69

LISTA DE TABELAS:

Tabela 1: Esquema do gradiente utilizado para a corrida cromatográfica das amostras.....	52
Tabela 2: Triagem fitoquímica do extrato e partições de <i>S. macranthera</i>	60
Tabela 3: Teor de fenóis totais e flavonoides do extrato e partições de <i>S. macranthera</i>	63
Tabela 4: Atividade antioxidante do extrato e partições de <i>Senna macranthera</i> ...	64
Tabela 5: Atividade antimicrobiana do extrato metanólico e partições de <i>S. macranthera</i> frente a diversos microorganismos.....	65
Tabela 6: Porcentagem de inibição do edema de pata induzido por carragenina do extrato bruto e partição em hexano de <i>S. macranthera</i>	69

LISTA DE ABREVEATURAS:

[K₃Fe(CN)₆]: Ferricianeto de potássio
AIE: Antiinflamatório esteroideal
AINE: Antiinflamatório não esteroideal
AlCl₃: Cloreto de alumínio
CCD: Cromatografia em camada delgada
CH₂Cl₂: Diclorometano
Cl⁻: Cloreto
CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência
COX: Ciclooxygenase
DMSO: Dimetilsulfóxido
DPPH: 2,2'-difenil-1-picrihidrazilo
EROS: Espécies reativas de oxigênio
EtOH: Etanol
F.A.: Fase aquosa
F.O.: Fase orgânica
Fe²⁺: ferro reduzido
Fe³⁺: ferro oxidado
FeCl₃: Cloreto férrico
HCl: Ácido clorídrico
Hex: Hexano
KOH: Hidróxido de potássio
LDL: lipoproteína de baixa densidade
MeOH: Metanol
Na₂CO₃: Carbonato de sódio
NaCl: Cloreto de sódio
NaOH: Hidróxido de sódio
n-BuOH: Butanol
NH₄OH: Hidróxido de amônia
NO: Óxido nítrico
OH: Hidroxila
PGI₂: Prostaciclina

PGs: Prostaglandinas

RLs: Radicais livres

S.R.: Solução reagente

TR: Tempo de retenção

U.V.: Ultravioleta

v.o: Via oral

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO.....	15
1.1 - A FAMÍLIA FABACEAE.....	17
1.2 - CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O GÊNERO <i>SENNA</i>	19
1.3 - BIOGÊNESE E ESTRUTURA DE COMPOSTOS ANTRACÊNICOS...21	
1.4 - A ESPÉCIE <i>Senna macranthera</i> (COLLAD.) H.S. IRWIN & BARNEBY.....	24
1.5 - CONSTIPAÇÃO INTESTINAL E TRATAMENTOS COM AGENTES LAXATIVOS.....	25
1.6 - ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA E PRODUTOS NATURAIS.....	29
1.7 - ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS DA INFLAMAÇÃO E TRATAMENTOS.....	31
1.8 - PLANTAS MEDICINAIS E RESISTÊNCIA MICROBIANA.....	33
1.9 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	34
1.10 - SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES.....	36
1.11 - LETALIDADE PARA <i>Artemia salina</i>	39
1.12 - ATIVIDADE LEISHMANICIDA	40
2– OBJETIVO.....	42
2.1 - OBJETIVO GERAL.....	42
2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42
3 - MATERIAL E MÉTODOS.....	43
3.1 - COLETA DA PLANTA E PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS.....	43
3.1.1 - Material vegetal.....	43
3.1.2 - Preparo do extrato bruto de sene comercial.....	44
3.1.3 - Preparo das partições.....	44
3.2 - ESTUDO FITOQUÍMICO.....	45
3.2.1 - Triagem fitoquímica.....	45
3.2.2 – Preparo das amostras para identificação dos metabólitos especiais.....	45
3.2.3 – Pesquisa de compostos antracênicos.....	47

3.2.4 – Extração ácido-base de alcaloides.....	48
3.2.5 - Teor de flavonoides.....	50
3.2.6- Teor de fenóis totais.....	50
4.2.7- Cromatografia em camada delgada.....	51
3.2.8- Cromatografia de alta eficiência.....	51
3.3 - ATIVIDADES BIOLÓGICAS <i>IN VITRO</i>	52
3.3.1 - Atividade antioxidante.....	52
3.3.1.1 - Teste com DPPH.....	52
3.3.1.2 - Poder de redução.....	53
3.3.2 - Atividade citotóxica.....	53
3.3.3 - Atividade leishmanicida.....	54
3.3.4 - Atividade antimicrobiana.....	55
3.4 - ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS <i>IN VIVO</i>	56
3.4.1 – Animais.....	56
3.4.2 - Motilidade intestinal.....	56
3.4.3 - Atividade laxativa.....	57
3.4.4 - Atividade anti-inflamatória.....	58
3.5 - ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	59
4 – RESULTADOS.....	60
5 – DISCUSSÃO.....	70
6 – CONCLUSÕES.....	79
REFERÊNCIAS.....	80
ANEXO.....	99

1 - INTRODUÇÃO

A terapêutica moderna, composta de um grande número de medicamentos com ações específicas sobre receptores, enzimas e canais iônicos, não teria sido possível sem o suporte dos produtos naturais, especialmente daqueles provenientes das plantas superiores, das toxinas animais e dos micro-organismos. O uso de produtos naturais na medicina popular como agente terapêutico é conhecido por praticamente todas as civilizações antigas. Muitas culturas utilizaram estes produtos por serem a principal, ou mesmo a única matéria prima para a elaboração de medicamentos, novas drogas, permitindo o avanço na descoberta de agentes terapêuticos contra doenças infecciosas, cânceres, doenças crônicas, doenças parasitárias e outras. O valor dos produtos naturais está claramente reconhecido, e os desafios são identificar novos compostos bioativos e elucidar seus mecanismos de ação (CALIXTO, 2001).

A maneira de se pesquisarem novos compostos biologicamente ativos sofreu grandes mudanças, principalmente devido aos avanços tecnológicos. A indústria farmacêutica e as universidades têm um papel importante no desenvolvimento de novos métodos, que podem propiciar, de forma mais rápida, o surgimento de novos medicamentos no mercado. A avaliação biológica foi uma das mais significantes mudanças na área de produtos naturais nos últimos anos. O entendimento dos mecanismos da doença, acompanhado do aumento de testes com receptores e enzimas disponíveis, permitiram o desenvolvimento de sistemas eficientes e rápidos de bioensaios. Dessa forma, um único sistema permite selecionar milhares de amostras em poucos dias (CORDELL, 1995).

A atividade biológica de uma substância é mensurada pela sua capacidade de exercer um determinado efeito biológico que possa ser quantificado. Os ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo* que avaliam essa atividade baseiam-se na sua competência de promover aumento ou diminuição dos efeitos terapêuticos causados no sistema fisiológico no geral. A partir desses efeitos determina-se dose, toxicidade, tempo de ação, interação da droga com o organismo e outros.

Um outro grande desafio tem sido desvendar e validar cientificamente espécies vegetais com potencial clínico. Nesta escalada ascendente, a Organização Mundial de Saúde (OMS) considera 252 medicamentos essenciais e básicos à

saúde humana, sendo que 11% são viabilizados a partir de espécies vegetais, ditas medicinais (RATES, 2001; RASKIN *et al*, 2002; DAVID, NASCIMENTO e DAVID, 2004).

As espécies vegetais constituem uma estratégia para a inovação farmacêutica e competitividade do setor, tendo em vista a singularidade estrutural dessas substâncias, efetividade terapêutica e expectativas de patenteabilidade devido a parcerias científicas entre a indústria farmacêutica e instituições de ensino e pesquisa. Estudos exaustivos ao longo dos anos, em áreas multidisciplinares, viabilizaram o isolamento de inúmeras moléculas bioativas, hoje utilizadas com efetividade na clínica convencional (OLIVEIRA e BRAGA, 2003).

São inúmeros os exemplos de medicamentos desenvolvidos direta ou indiretamente de fontes naturais, sobretudo de plantas. Destaca-se a morfina, a pilocarpina, os digitálicos, os curares, a quinina, a artemisinina, a atropina, a escopolamina, as estatinas, o cromolin, as drogas usadas no tratamento de câncer (vimblastina, vincristina, taxol, campotecinas), os imunossupressores, os antibióticos e os inibidores da enzima conversora de angiotensina, como o captopril (VERPOORTE, 1999; GRABLEY e THIERICKE, 1999; BARREIRO e FRAGA, 2001, OLIVEIRA e ALVES, 2002).

Ainda são relativamente poucos os trabalhos que avaliam a eficiência, o potencial terapêutico e a segurança de medicamentos à base de produtos naturais (CALIXTO, 2000). Maiores estudos são necessários para se investigar a atividade de extratos brutos das plantas e sua relação com os diferentes constituintes encontrados, a fim de descobrir seus componentes bioativos (ELVIN-LEWIS, 2001). O desenvolvimento de medicamentos a partir de recursos naturais ganhou novo impulso por interesse tanto da sociedade quanto das indústrias farmacêuticas (MENTZ e SCHENKEL, 1989; RATES, 2001). Este fato deve-se ao contexto social e econômico, pois cerca de 65 - 80% da população mundial fazem uso de plantas medicinais para cuidados básicos de saúde (CALIXTO, 2001). No Brasil, como em diversos países, grande número de vegetais está sendo utilizado como fonte de extração de novas substâncias. Cerca de 60% dos fármacos lançados por indústrias norte-americanas entre 1985-1995 são de origem vegetal.

A investigação sobre produtos naturais com atividade farmacológica também aumentou significativamente nos últimos anos no Brasil. Entretanto, apesar da rica biodiversidade, somente estão disponíveis dados sobre 44 espécies de plantas

pertencentes a 20 famílias, com atividades comprovadas, incluindo espécies nativas e exóticas apesar de existir uma crescente demanda para produtos naturais por indústrias farmacêuticas nacionais e internacionais, o que impulsiona as investigações científicas e a busca por drogas naturais (DUARTE, 2006).

A evolução científica dos estudos de produtos naturais no Brasil teve seu marco histórico na fitoquímica clássica (isolamento e determinação estrutural), implantada e estruturada pelos pesquisadores de excelência, de onde surgiram os grupos consolidados e atuantes na área por todo o país. É importante salientar que vários desses grupos de pesquisa vêm alterando o enfoque da fitoquímica tradicional, privilegiando trabalhos que envolvem atividade biológica, ecologia química e biossíntese de micromoléculas de plantas (PINTO, 2002).

A descoberta de novas drogas para o tratamento de várias enfermidades representa uma grande necessidade da humanidade, e as substâncias de origem vegetal constituem uma importante fonte para o desenvolvimento de novos princípios ativos mais eficientes no tratamento dessas doenças (RAVELO, 2004).

A potencialidade da região sudeste como fonte de plantas ainda não estudadas, sob o ponto de vista químico e biológico, vem estimulando uma série de pesquisas visando à descoberta de princípios ativos e ao desenvolvimento de novos fármacos.

Neste estudo, a ênfase foi destinada ao estudo químico e biológico da espécie *Senna macranthera*, pertencente à família Fabaceae, conhecida popularmente como fedegoso, muito utilizada como planta ornamental e para arborização de cidades (LORENZI, 1992).

1.1 - A FAMÍLIA FABACEAE

Espécies da família Fabaceae, também conhecida por Leguminosae, estão distribuídas em diversos ecossistemas do mundo e apresentam relevante importância econômica. Representa a terceira maior família das angiospermas, com cerca de 727 gêneros e aproximadamente 19.327 espécies. Divide-se nas subfamílias *Caesalpinioideae*, *Mimosoideae* e *Papilionoideae* (*Faboidea*) (LEWIS e LIMA, 2005). Apresentam hábitos variados, desde ervas perenes até árvores de

grande porte. As folhas, em geral, são compostas com inflorescência racemosa. As flores possuem corola e pétalas desiguais, com exceção das *Mimosoideae*, que apresentam corola de simetria radiada, já os frutos são do tipo legume e suas variações, como legume que se abre em duas partes, nucóide e samaróide, lomento, folículo, sâmara e carnosos (BARROSO *et al*, 1991; 1999).

Caesalpinioideae compreende 171 gêneros e 2.250 espécies muito bem representados no Brasil, dos quais o que apresenta maior número de espécies é o gênero *Senna* (LEWIS e LIMA, 2005). Segundo Barroso, *et al* (1991), as espécies nativas correspondem a 64 gêneros e 790 espécies. Nos campos rupestres, a subfamília está representada por sete gêneros e 94 espécies (GARCIA e DUTRA, 2004) sendo também abundantes na América do Sul, África tropical e sudeste da Ásia (COWAN, 1981).

Na Mata Atlântica, a família Fabaceae representa uma das famílias com maior riqueza de espécies, ocorrendo em vários tipos de ambientes (LIMA, 2000). Tem sido sugerido que a sua origem e diversificação, intimamente relacionadas com as florestas tropicais, indicam um elevado potencial como objeto de análise em investigações numa abordagem ecológica (LIMA, 2004).

A importância econômica dessa família é muito diversificada, já que é utilizada desde a alimentação humana e animal até a produção de corantes, óleos, lubrificantes, perfumes, tintas, inseticidas. Ainda possui uso medicinal, agrônomico (enriquecimento de solos) e ornamental. É usada principalmente para produção de madeiras nobres e valiosas usadas na marcenaria, entalhadura e construções em geral. Lima *et al*, (1994) relataram que as leguminosas vêm sendo apontadas como uma das principais fontes para a produção de proteína vegetal, particularmente para os países subdesenvolvidos.

A química da família Fabaceae é muito peculiar; apresentam os isoflavonoides como os metabólitos característicos e em grande variedade (BRANDI, 1997). As atividades biológicas dos isoflavonoides têm sido muito estudadas, por exemplo, a genisteína, que possui atividade inibitória contra a topoisomerase II e tirosina quinase e inibe a proliferação do câncer (AKIYAMA *et al*, 1987; WANG *et al*, 2001). Os isoflavonoides são capazes de promover benefícios à saúde, pois estão relacionados com a capacidade de atuarem como antioxidantes (COS *et al*, 2001). Além disso, são considerados fitoestrogênios, cujo mecanismo de ação é baseado na inibição dos receptores de estrogênio por ação competitiva com o hormônio. Eles

podem reduzir os riscos de alguns cânceres hormônio dependente, incluindo os de próstata e mama (MERKEN e BEECHER, 2000; VEITCH, 2007).

1.2 - CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O GÊNERO *Senna*

O gênero *Senna* é constituído por mais de 600 espécies incluindo arbustos, árvores e ervas, distribuídas em regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo (AGARKAR e JUDGE, 1999). Algumas espécies são bastante apreciadas devido à beleza de suas flores e, por consequência, muito utilizadas como plantas ornamentais. Recentemente, revisões na classificação botânica dos gêneros *Cassia* e *Senna* levaram à transposição taxonômica de espécies do gênero *Cassia* para o táxon *Senna*. Espécies de *Cassia*, juntamente com algumas que mudaram para o grupo *Senna* após o novo sistema de classificação taxonômica adotado, constituem um dos maiores gêneros da família Fabaceae (VIEGAS *et al*, 2006).

Espécies do gênero *Senna* revelaram uma grande diversidade de substâncias inéditas e bioativas, com padrões moleculares variados. A literatura descreve o isolamento de cerca de 350 metabólitos secundários em espécies desse gênero que se encontram amplamente distribuídas em várias partes do mundo. Estes estudos evidenciaram a ocorrência de substâncias de diversas classes, sendo as antraquinonas, flavonoides e outros compostos fenólicos os constituintes mais frequentes na maioria das espécies (VIEGAS *et al*, 2006).

Espécies do gênero *Senna* são conhecidas pela sua utilização popular em algumas regiões da Índia, Ásia e África, como laxativos e purgativos. Estudos farmacológicos de algumas espécies comprovaram sua propriedade antibacteriana (SAMY *et al*, 2000), antifúngica (PALAMICHAMY e NAGARAGAN, 1990), anti-inflamatória (CUELLAR *et al*, 2001), hepatoprotetora (JAFRI *et al*, 1999) e antimalárica (TONA *et al*, 1999), o que demonstra o potencial farmacológico deste gênero vegetal.

Com o interesse de se buscarem novas substâncias bioativas, o gênero *Senna* tornou-se alvo de estudos, como é o caso de *S. reticulata*, planta amplamente distribuída em quase toda América Latina. No Brasil, é utilizada na medicina popular para o tratamento de obstruções do fígado e no combate ao reumatismo (CORRÊA,

1984). No trabalho realizado por Santos e Silva, (2008) foram relatados os resultados do estudo fitoquímico, descrevendo-se o isolamento e a identificação de seis antraquinonas. Este foi o primeiro registro das substâncias 1,3,8-triidroxiantraquinona e 1,6,8-triidroxi-3-metoxiantraquinona em plantas superiores, antes só isoladas de microorganismos.

S. fistula, muito cultivada na China, Egito, Ceilão e Índia, é utilizada popularmente como purgativa, antirreumática, hipoglicemiante, antimicrobiana e anti-inflamatória. Um estudo realizado por Sunil e Muller (1998) demonstrou que extratos dos frutos apresentavam um potencial anti-inflamatório devido à inibição de mediadores do processo de inflamação, como leucotrienos.

Algumas espécies de *Senna*, tais como *S. spectabilis*, *S. carnavall* e *S. excelsa*, revelaram a presença de alcaloides piperidínicos como constituintes majoritários e, portanto, de grande importância na bioprospecção de novos fármacos (VIEGAS *et al*, 2004). Estas substâncias são particularmente interessantes, em virtude das propriedades tóxicas e farmacológicas demonstradas em diversos ensaios *in vitro* e *in vivo* realizados com extratos e substâncias puras isoladas de *S. excelsa* e *S. spectabilis*, dentre outras.

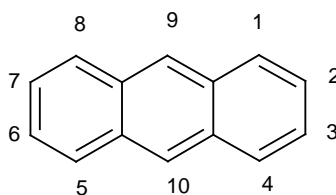
De acordo com estudos realizados por Samy e Ignacimuthu, (2000), extratos das folhas de *S. occidentalis* e *S. auriculata* são utilizados como bactericidas apresentando atividade contra *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*. Além disso, é utilizada popularmente em países africanos como purgativa, diurética e como loção ocular (TONA *et al*, 1999). A presença abundante de derivados antracênicos nos extratos estudados indicou que tais substâncias poderiam ser as responsáveis por tais atividades, em especial a 1,8-diidroxi-antraquinona (TIWARI e MISRA, 1985; TONA *et al*, 1999).

S. alexandrina, conhecida popularmente como sene-de-alexandrina, *tinevelly* ou sene, é amplamente usada para constipação intestinal ou em situações em que se quer um esvaziamento intestinal (exames radiográficos, pré e pós-operatórios). As partes da planta utilizadas como matéria-prima são as folhas secas e as vagens. O sene está incluído entre os laxativos antranóides, que possuem como princípios ativos os glicosídeos chamados de senosídeos A e B. Muitos estudos têm sido publicados sobre a toxicidade dos extratos *Senna* e compostos purificados, tais como senosídeos e reína. De maneira geral, eles exibem baixa toxicidade em ensaios com animais. Além disso, nenhum relato de atividade teratogênica ou genotóxica foi

detectado (HEIDEMANN et al, 1993; BRUSICK e MENGS, 1997; MENGS *et al*, 2004; MITCHELL *et al*, 2006). Porém, o consumo regular, por pelo menos um ano, causa alterações morfológicas no reto e cólon e escurecimento da mucosa no mesmo local, reversíveis com a interrupção do uso (SIMÕES *et al*, 2007).

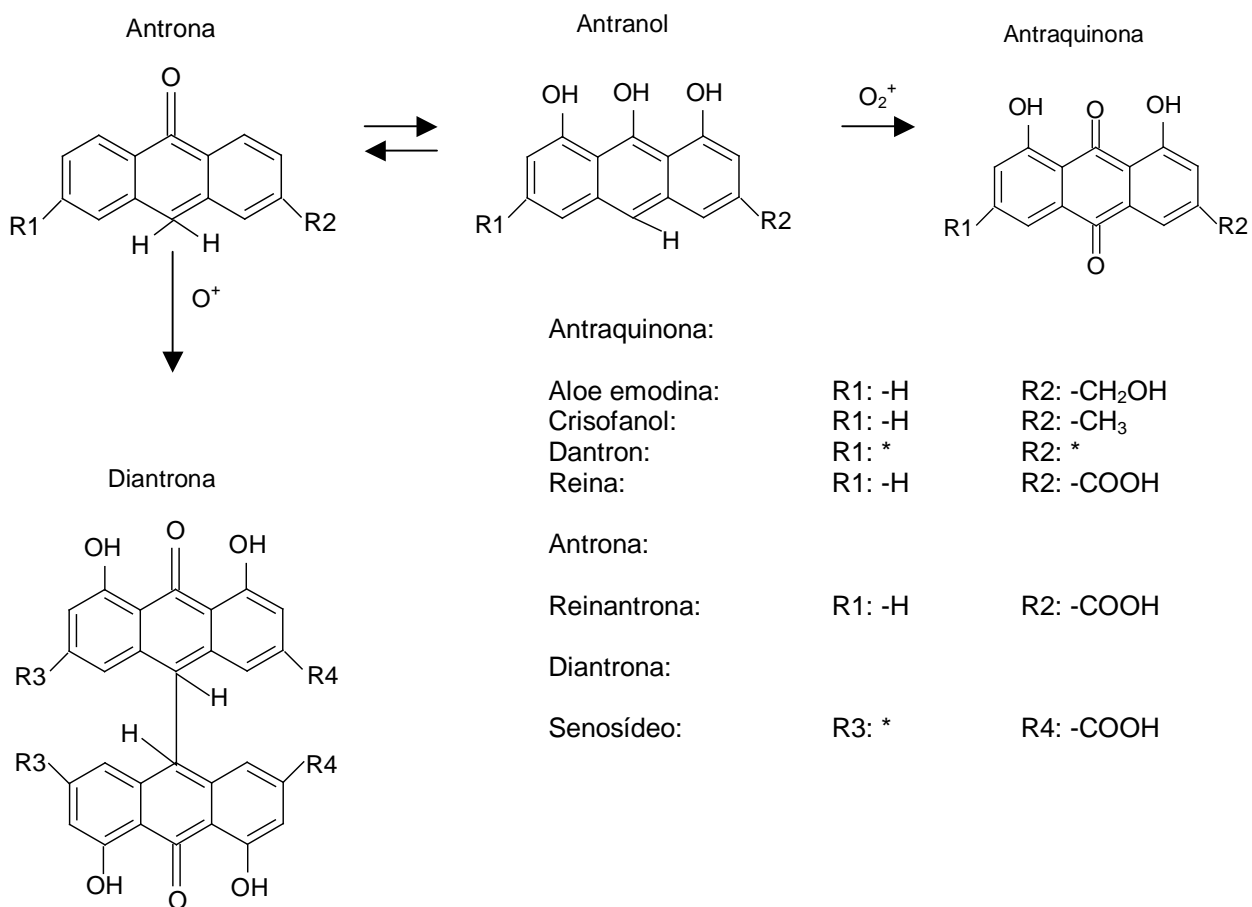
1.3 - BIOGÊNESE E ESTRUTURA DE COMPOSTOS ANTRACÊNICOS

A elevada capacidade biossintética das plantas, evidenciada pelo grande número de substâncias produzidas e sua diversidade em uma mesma espécie, constitui a principal característica do seu metabolismo secundário. Os compostos antracênicos são uma classe de metabólitos que tem como núcleo fundamental um anel tricíclico antracênico (desenho 1). Estes anéis podem ser substituídos com hidroxila, carboxilas ou grupos metila, já o grupamento hidroxila ou carbonila no C-9 e um grupo hidroxila no C-8 são responsáveis pela função laxante. Há, então, a formação de monoantronas, tais como aloe-emodina, reína e frangulina. Essas monoantronas podem se conjugar para formar diantronas ou se ligarem a açúcares formando glicosídeos. Diferentes plantas produzem diferentes compostos antracênicos, como, por exemplo, o gênero *Senna*, que contém antraquinonas como reína, e aquelas glicosiladas, como senosídeos A e B. Já a *Cascara*, *Aloe* e *Rheum* produzem outros tipos de antraquinonas (HATTORI *et al*, 1988; VAN, 1976).



Desenho 1: Estrutura química do anel antracênico. (Fonte: VAN GORKON *et al*, 1998).

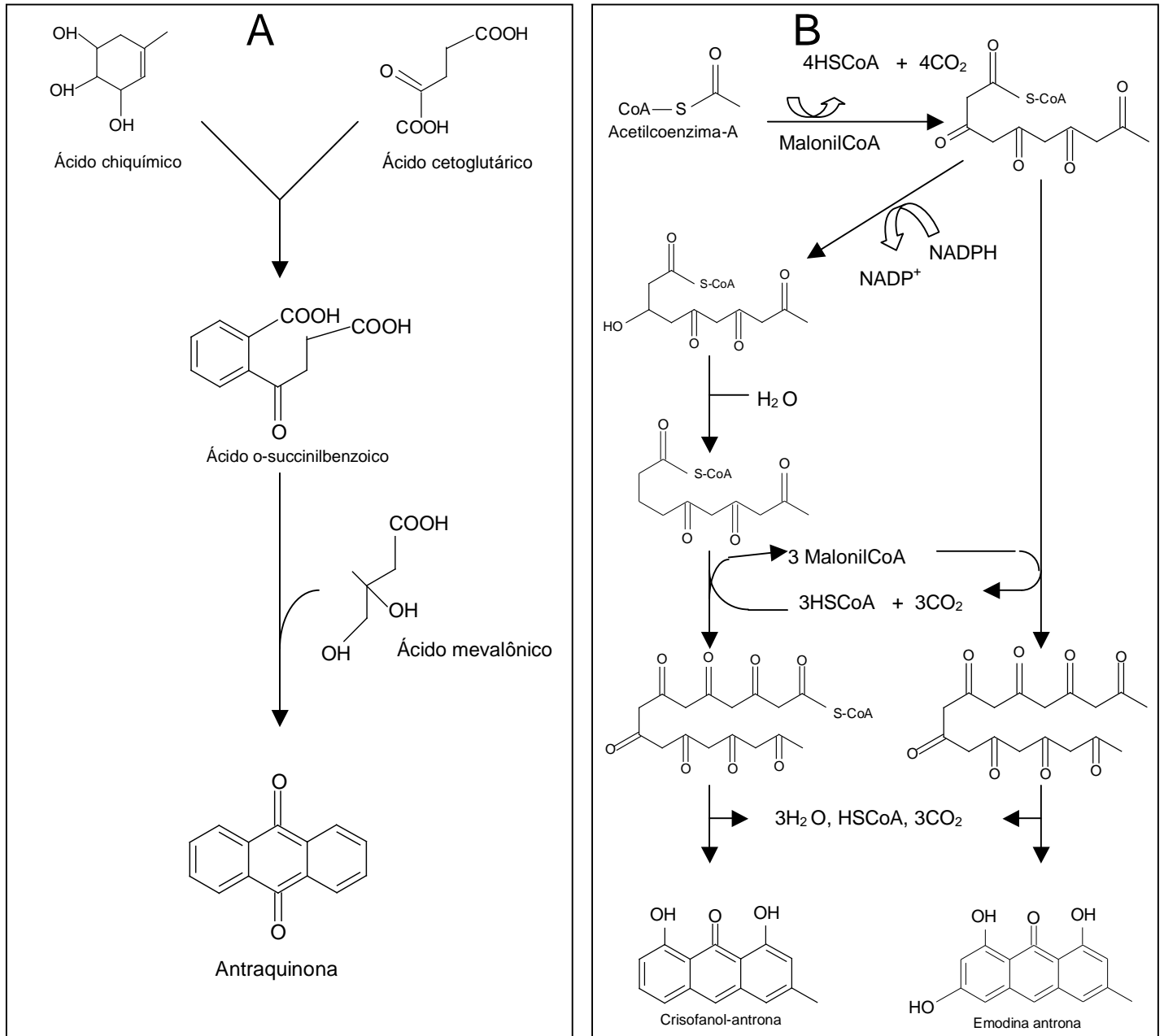
Os grupos existentes no C-10 permitem que essa classe seja dividida em três grupos: antraquinonas, antronas e diantronas. Cada um desses grupos pode ser transformado um no outro por meio de reações de oxidação e redução (desenho 2).



Desenho 2: Reações de redução e oxidação no grupo antracênico. Antraquinona contendo =O no C-10 formado por reação oxidativa com antranol; antrona contendo H₂ formado por reação de redução com o antranol no C-10; e conjugação de duas antronas formando uma diantrona (Fonte: VAN GORKON *et al*, 1998).

Nas plantas, a maioria dos compostos antracênicos possui um ou dois grupos glicosídicos, principalmente, glicose e ramnose, que se encontram ligados em C- 8, C-10 e, ocasionalmente, em C-1. Apresentam-se na forma oxidada em plantas secas e na forma reduzida em plantas frescas. As antronas são os primeiros grupos antracênicos que se formam nas plantas, possuem função oxigenada na posição C- 9 e a maioria se encontra glicosilada. As antraquinonas são mais estáveis, formadas a partir das antronas livres através de auto-oxidação ou por reações enzimáticas (peroxidases e oxidases). As antronas também podem ser transformadas em diantronas e naftodiantronas, essa última desprovida de ação laxante (GROS *et al*,

1985). Podem ser sintetizadas a partir de unidades de acetilcoenzima A ou de ácido *O*-succinilbenzoico, que vão determinar a distribuição desses compostos antracênicos dentro do gênero *Senna* (desenhos 3 A e 3B).



Desenho 3: Rotas biossintéticas de compostos antracênicos A) pela via do acetilcoenzima A; e B) pela via do ácido *O*-succínico (Fonte : SIMÕES *et al*, 2007).

1.4 - A ESPÉCIE *Senna macranthera* (COLLAD.) H. S. IRWIN & BARNEBY

Senna macranthera (Collad.) H.S. Irwin & Barneby, corresponde a *Cassia speciosa* var. *nervosa* (Vogel) Betham e é conhecida popularmente como manduirana, pau fava, aleluia, mamangá e fedegoso. Nos ecossistemas brasileiros, particularmente na Mata Atlântica, é amplamente distribuída nas regiões Sul, Sudeste, Nordeste e Centro-Oeste, ocorrendo principalmente em formações florestais ombrófilas e estacionais. Também pode aparecer em áreas de Cerrado, Caatinga e Campos Rupestres. No Estado do Rio de Janeiro habita principalmente as florestas montanas e submontanas das encostas das serras do Mar e da Mantiqueira. É ideal para arborização urbana, além de se prestar à composição de plantios em áreas degradadas por ser espécie pioneira e de rápido crescimento. Sua madeira é utilizada principalmente para a fabricação de caixotaria leve, confecções de brinquedos, lenha e carvão (LORENZI, 1992).

Caracteriza-se por ser uma árvore ou arbusto de 3 m a 15 m de altura com ramos, raque foliar e folíolos densos e aos pares, flores de coloração amarela, muito vistosa e em cachos; fruto legume bacoide; sementes alojadas em “câmaras” separadas por falsos septos e embebidas em polpa fétida (IRWIN e BARNEBY, 1982) (fotografia 1).

Após extensa revisão bibliográfica em busca de informações sobre seu potencial farmacológico e caracterização química, verificou-se que já foi isolado de seu endosperma, um polissacarídeo galactomanana constituído de manose e galactose, cujo derivado sulfatado apresentou atividade anticoagulante (PIRES *et al*, 2001). Também já foi isolada a rubrofusarina, um policetídeo inibidor da topoisomerase II- α humana, importante enzima na replicação do DNA (BRANCO *et al*, 2008).

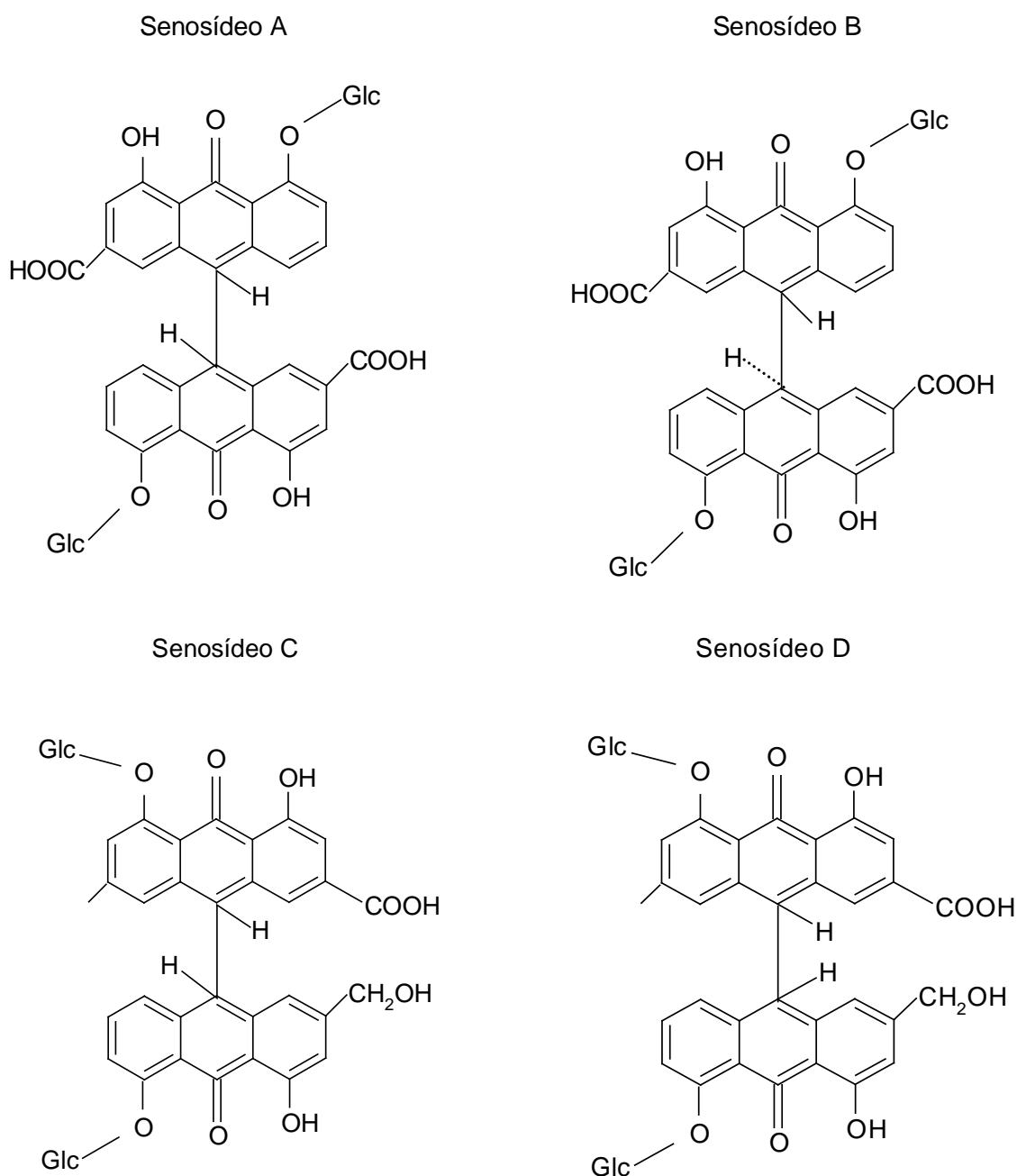


Fotografia 1: *Senna macranthera* (Collad.) H. S. Irwin & Barneby. Detalhes do habitat, inflorescência, fruto e sementes (Fonte LORENZI, 1992).

1.5 - CONSTIPAÇÃO INTESTINAL, TRATAMENTOS E AGENTES LAXATIVOS

Espécies do gênero *Senna* são muito utilizadas na medicina popular como um potente agente laxativo (VALVERDE, et al, 1999 e AREZZO, 2000). Também apresentam outras atividades farmacológicas relacionadas com os diversos componentes químicos presentes em sua composição, sobretudo a capacidade de promover a motilidade e secreção do trato gastrointestinal (BRUSICK e MENGS, 1997; LAN *et al*, 2001).

Foi demonstrado que os senosídeos A, B, C e D são os principais compostos responsáveis por esse efeito laxativo (desenho 4). Eles são farmacologicamente inativos, comportando-se como pró-drogas naturais e são as formas de transporte de maior potência farmacológica; porém, pela reduzida lipossolubilidade, têm maiores índices de absorção que as antraquinonas livres.



Desenho 4: Estrutura química dos senosídeo A, senosídeo B, senosídeo C e senosídeo D (fonte: VAN GORKON *et al*, 1998).

A reinantrona é o metabólito ativo responsável pelo efeito laxante (YAGI *et al*, 1991) do sene e é liberada no intestino grosso pela flora bacteriana após hidrólise dos glicosídeos. Já as antronas e diantronas são dez vezes mais ativas que as antraquinonas e constituem as formas realmente ativas das substâncias antracênicas (LEMLI, 1988).

Vários mecanismos de ação têm sido propostos para explicar o efeito laxativo de antraquinonas, os quais incluem a inibição da Na/K-ATPase (GAGINELLA, 1978), a estimulação direta de contração da musculatura lisa do intestino pelo aumento da motilidade, relacionada com a liberação de prostaglandina (BEUBLER e KOLLAR, 1988), histamina (CAPASSO *et al*, 1986) ou serotonina (BEUBLER e SCHIRGI-DEGEN, 1993) e inibição dos canais de Cl⁻, comprovada para inúmeras 1,8-hidroxiantranoides como aloe-emodina (HÖNIG *et al*, 1992). No entanto, apesar de numerosos mecanismos de ação já terem sido propostos para explicar o efeito laxante do sene, seu mecanismo de ação preciso ainda não foi claramente elucidado.

Sabe-se que a constipação intestinal consiste em dificuldade para evacuar, fezes endurecidas e secas e dores abdominais. Ocorre com maior frequência nas mulheres do que nos homens, sem que haja explicação para isso. Os mais idosos também têm maior frequência de constipação do que os mais jovens, o que pode ser associado à menor ingestão alimentar, perda da mobilidade, fraqueza das musculaturas abdominal e pélvica e medicações (LOCKE, PEMBERTON e PHILLIPS, 2000).

A maioria dos pacientes que apresenta o quadro de constipação, não procura ajuda médica para realizar o tratamento. Quando os sintomas permanecem, é necessário buscar as causas primárias da constipação e determinar qual tratamento mais adequado.

A mudança no estilo de vida, que inclui modificações na dieta, maior atividade física, ingestão de maior quantidade de líquidos, reeducação intestinal e auxílio de preparados de fibras vegetais podem ser os componentes de terapêutica de sucesso para a maioria dos casos de constipação intestinal.

Diversos tipos de laxantes são prescritos, e um número ainda maior é obtido sem prescrição, indicando uma preocupação cultural pela regularidade intestinal. Em geral, esses fármacos são classificados, com base no seu mecanismo de ação, em

agentes expansores da massa, agentes osmóticos (amolecedores do bolo fecal) e agentes irritantes ou estimulantes.

Laxantes expansores de massa são polímeros orgânicos que interagem com a água e têm a capacidade de mantê-la retida nas fezes. Dentre tais polímeros podemos incluir as fibras dietéticas como farelo, medicamentos como *Psyllium*, polímeros sintéticos como metilcelulose. Sua principal função é evitar a absorção de água pelo intestino delgado e conservá-la retida nas fezes. O aumento do volume e peso das fezes estimula a motilidade e acelera o trânsito intestinal do bolo fecal. Um dos principais efeitos colaterais que ocorrem são provocados pela fermentação dessas fibras, causando a formação de gases e flatulências, inchaços e retenção de líquidos (BURROWS e MERRITT, 1983).

Os agentes osmóticos são íons ou moléculas volumosas adicionadas ao conteúdo intestinal, que retêm água dentro do lúmen por efeito de força osmótica, ou que estimulam secreções intestinais ou motilidade, assim causando o aumento da frequência e facilidade de defecação (SCHILLER, 2001). Íons como o magnésio, fosfato ou sulfato retêm água no intestino por força osmótica e provocam distensão, estimulando suas contrações. As soluções eletrolíticas isosmóticas que contêm polietilenoglicol são utilizadas como soluções para lavagem do cólon, principalmente, na preparação de procedimentos radiológicos ou endoscópicos, bem como para remoção de toxinas ingeridas (KATSUNG, 2003). Um outro exemplo é a lactulose, um dissacarídeo sintético (galactose-frutose), que não é absorvido pelo intestino, mas pode ser metabolizado por bactérias intestinais e se transformar em um ácido graxo de cadeia curta, que é facilmente absorvido, ou pode permanecer no lúmen, exercendo suas atividades osmóticas (HAMMER *et al*, 1989). Sorbitol e manitol são álcoois de açúcares, assim como a lactulose; também não são absorvidos pelo intestino. Em um estudo realizado por Lederle *et al* (1990), observou-se que o tratamento com sorbitol era tão eficaz quanto a lactulose. Sua maior vantagem é o baixo custo.

Laxantes amolecedores do bolo fecal têm a capacidade de se emulsificarem com as fezes e amolecê-las, facilitando seu trânsito (KATSUNG, 2003). Destaca-se o óleo mineral, que administrado via oral, não é quimicamente ativo no corpo, porém altera as características físicas das fezes agindo como um lubrificante do bolo fecal. Sua utilização em longo prazo pode causar má absorção de vitaminas lipossolúveis, e sua absorção pelo intestino pode causar reações de corpo estranho na mucosa

intestinal e linfonodos regionais. Além disso, pode causar problemas no tônus do esfíncter anal (SCHILLER, 2001).

Laxantes estimulantes e irritantes do trato intestinal são chamados assim porque têm a finalidade de estimular a motilidade (SCHILLER, 1997). Incluem o óleo rícino, o bisacodil e também as antraquinonas encontradas nos gêneros *Cascara* e *Senna* (KATSUNG, 2003). Os derivados de difenilmetano, como por exemplo, o bisacodil - um éster diacético - utilizado como catártico e hidrolisado no intestino delgado e cólon por enterases endógenas, depois convertido para sua forma livre que apresenta os grupos difenólicos. Tal medicamento tem seu efeito obtido entre seis e oito horas (FLIG *et al*, 2000).

1.6 - ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E PRODUTOS NATURAIS

A busca de novos compostos anti-inflamatórios (VERPOORTR, 1999) tem sido prioridade das indústrias farmacêuticas há algum tempo. Dois fatores são determinantes nesse interesse: primeiramente compostos anti-inflamatórios, tais como os opioides, AIEs e AINEs, que apresentam uma variedade de efeitos colaterais estão abrindo espaço para a descoberta de novos e mais seguros compostos (MULLER, LNSEL e MELNON, 1978; AHMADIANI *et al*, 1998; VERPOORTE, 1999). Em segundo lugar, o mercado nacional e internacional desses medicamentos, estimado em vários bilhões de dólares (FLOWER, MONCADA e VANE, 1975).

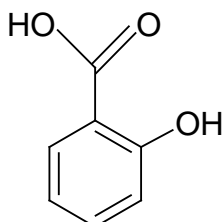
Por suas propriedades terapêuticas ou tóxicas, as plantas adquiriram fundamental importância na medicina popular. Com o desenvolvimento das ciências naturais e do método científico na medicina, os medicamentos de origem vegetal tornaram-se objeto de análise científica (MARTINS, 2000).

Esforços têm sido feitos no sentido de melhorar os produtos naturais, aumentando as propriedades desejadas e minimizando seus efeitos colaterais adversos (SCHULZ, HANSEL e TYLER, 2002). Inúmeros são os registros que mostram a busca incessante, nas plantas medicinais, para a cura ou mesmo alívio de moléstias que têm atingido impiedosamente a humanidade (CARLINI, 1995). A

procura por novos agentes farmacologicamente ativos, obtidos de plantas, tem levado à descoberta de muitas drogas clinicamente ativas.

Diversas plantas da flora brasileira são utilizadas na medicina popular, mas muitas delas ainda necessitam de estudos que deem suporte científico ao seu uso na terapêutica (BRITO e BRITO, 1993).

A aspirina é um dos exemplos mais conhecidos com atividade anti-inflamatória. Conhecida como ácido acetilsalicílico, foi sintetizada por Kolbe, na Alemanha, em 1874 e produzida com base na estrutura química de uma substância natural isolada do salgueiro branco (*Salix alba*). É um dos medicamentos mais vendidos em todo o mundo (AGOSTA,1997) (desenho 5).



Desenho 5: Estrutura química do ácido salicílico extraído de *Salix alba*.

Flavonoides e terpenoides têm sido relatados por apresentarem efeito inibitório da enzima lipoxigenase e ciclooxigenase (NARAYANA *et al*, 2001; KIM *et al*, 2004; GUTIERREZ-LUGO *et al*, 2004; ORHAN *et al*, 2006; KUPLEI *et al*, 2006).

O extrato das folhas de *S. alata* e da substância isolada campferol-3-O-gentiobiosídeo apresentaram atividade anti-inflamatória e o efeito inibitório da liberação de histamina, da 5-lipooxigenase e da ciclooxigenase (COX₁ e COX₂) foi observado por Moriyama *et al* (2003), mesmo com administração do extrato e do produto isolado em baixas concentrações.

Saponinas, como a glicirrizina, (isolada de *Glycyrrhiza glabra*) têm demonstrado importante atividade anti-inflamatória (SCHENKEL *et al*,2000).

1.7 - ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS DA INFLAMAÇÃO E TRATAMENTOS

A inflamação é uma resposta inespecífica a uma agressão externa. O agente responsável pela agressão pode ser de natureza física, biológica ou química. A resposta inflamatória independe da natureza do agente que a iniciou. Os sintomas que caracterizam o quadro de inflamação são dor, calor, rubor e edema, podendo ocorrer a perda da função da área lesionada. Esses sinais são provenientes da dilatação de arteríolas e aumento da permeabilidade vascular por ação de mediadores da inflamação. Com o aumento da temperatura, as reações metabólicas aceleram e liberam calor adicional. O edema surge com o aumento da permeabilidade, provocando o extravasamento de líquidos do meio intracelular para o meio extracelular. Podem extravasar fatores da coagulação para os tecidos, como o fibrinogênio, que é convertido a uma espessa rede de filamentos insolúveis de fibrina, onde microorganismos invasores são aprisionados, bloqueando a difusão no organismo. A dor pode resultar de fatores como: aumento da pressão, devido ao edema sobre tecidos e terminações nervosas; lesão das fibras nervosas; irritação, devido a substâncias tóxicas produzidas por micro-organismos; por cininas, que afetam algumas terminações nervosas. As prostaglandinas intensificam a dor associada à inflamação (CORREA e NOVELLI, 2000; TORTORA e GRABOWSSKI, 2000; CONSTANZO, 2004).

A resposta inflamatória é dividida em 3 fases: resposta aguda, resposta imune e resposta crônica. Na fase aguda, que é transitória, há o aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação e também extravasamento de proteínas, o que aumenta a viscosidade sanguínea. Na fase subaguda (resposta imune), ocorre migração dos leucócitos e das células sanguíneas até o agressor, obedecendo a um gradiente químico (quimiotaxia). O reconhecimento do agressor é feito por meio de marcadores proteicos ligados ao agente agressor, fenômeno conhecido por opsonização. Ocorre fagocitose, morte e degradação do invasor. A fase proliferativa crônica é caracterizada por degradação tecidual e fibrose (ABBAS, LICHTMAN e POBER, 2003).

Nessa primeira fase da inflamação há liberação de substâncias vasodilatadoras como histamina, prostaglandinas, leucotrienos e complementos que

têm a função de estimular a liberação de histamina, de atrair neutrófilos por quimiotaxia, de estimular fagocitose e algumas de destruir microorganismos (TORTORA e GRABOWSKI, 2000). Basófilos e mastócitos podem ser ativados diretamente por uma variedade de substâncias biológicas, como polibásicos, peptídeos, citocinas, anafilotoxinas e outros (ABBAS, LICHTIMAN e POBER, 2003). Os mastócitos são células mononucleadas localizadas nos tecidos de superfície de contato com o meio externo, como mucosas, serosas e pele. Contêm poderosos mediadores de reações inflamatórias agudas. Seu efeito biológico é causado, principalmente, pela liberação de aminas vasoativas.

Os anti-inflamatórios são fármacos que podem agir em várias etapas do processo fisiopatológico, inclusive podendo inibir a biossíntese de mediadores pela interação direta com as enzimas chaves (como inibidores da enzima ciclooxigenase), ou reduzir níveis de substratos (redução da liberação de ácido araquidônico), ou ainda, na inibição da liberação de mediadores estocados (histamina), ou por meio da imunoestimulação (maturação das células mieloides ou estimulação da fagocitose, removendo a substância irritante e diminuindo a agressão tecidual (SAFAIHY e SALIER, 1997)

A COX₁ está presente nas células em condições fisiológicas, principalmente nos vasos sanguíneos e plaquetas. Essa enzima é responsável pela produção de prostaglandinas que protegem a mucosa gástrica e os rins pela homeostase vascular (SOSLOW *et al*, 2000; KAM e SEE, 2000). Durante o processo inflamatório, a COX₁ tem a função de transformar o ácido araquidônico em prostaglandinas.

Já a COX₂ é expressa caracteristicamente por células envolvidas no processo inflamatório, como macrófagos, monócitos e sinoviócitos. Com a descoberta da COX₂, uma nova perspectiva terapêutica emergiu para o desenvolvimento de drogas mais seletivas e com menores efeitos adversos. O conjunto desses agentes originou uma nova geração de anti-inflamatórios (inibidores seletivos da COX₂), denominados de Coxibes (CARVALHO e LEMONICA, 2000).

Os glicocorticoides estão entre as drogas mais efetivas no tratamento de processos inflamatórios. Esses fármacos são conhecidos por produzirem diversas atividades biológicas e por alterarem a expressão gênica e a síntese de proteínas. Diversos estudos indicam que parte de seu efeito farmacológico é mediado pela indução de proteínas reguladoras, como a lipocortina (MORENO, 1997). A enorme utilidade clínica colocou essas substâncias entre os agentes mais frequentemente

prescritos. Além de suas atividades anti-inflamatórias, os glicocorticoides demonstraram importante papel no tratamento de doenças autoimunes, nas quais também foi observada a inibição das funções dos leucócitos (WILCKENS, 1995).

1.8 - PLANTAS MEDICINAIS E RESISTÊNCIA MICROBIANA

As propriedades antimicrobianas de plantas medicinais e de seus compostos isolados têm sido reconhecidas empiricamente durante séculos, mas foram confirmadas cientificamente apenas recentemente. Vários grupos de pesquisadores estudam a atividade biológica de plantas medicinais originárias de diversas regiões do mundo, orientados pelo uso popular das espécies nativas. Por outro lado, os micro-organismos que causam prejuízos à saúde humana estão se mostrando resistentes à maioria dos antimicrobianos conhecidos, o que incentiva ainda mais a procura por antibióticos de ocorrência natural. Extratos de plantas mostraram-se eficientes no controle do crescimento de uma ampla variedade de micro-organismos, incluindo fungos filamentosos, leveduras e bactérias (PORTILHO *et al*, 2001)

Testes antimicrobianos *in vitro* permitem a seleção de extratos brutos de plantas com propriedades potenciais de uso em estudos químicos e farmacológicos (PINTO *et al*, 2000). Os componentes antimicrobianos das plantas podem inibir o crescimento bacteriano e fúngico por diferentes mecanismos além daqueles presentes nos antimicrobianos em uso e tem um significativo valor clínico (ELOFF, 1988).

O aparecimento de resistência resulta em diversos fatores, tais como: uso crescente e inadequado de antimicrobianos, procedimentos invasivos, grande número de hospedeiros susceptíveis e falhas terapêuticas, entre outros, ocasionando aumento da transmissão de organismos multirresistentes. Muitas cepas são resistentes a quase todos antimicrobianos, e a perspectiva de aparecimento de uma cepa resistente a todos os micro-organismos constitui uma séria preocupação (SCHAECHTER *et al*, 2002).

Vários são os mecanismos pelos quais os microrganismos podem resistir aos efeitos dos antimicrobianos. Entre eles está a alteração da estrutura molecular dos antimicrobianos, a produção de enzimas que inativam a droga, a alteração das

proteínas ligadoras da penicilina ou outros pontos-alvo nas paredes das células, os alvos modificados da DNA-girase, as mutações de permeabilidade e as modificações ribossômicas (FILE Jr., 2000).

A necessidade de se encontrarem novas substâncias com propriedades antimicrobianas para serem estudadas no combate a esses microrganismos representa um desafio no tratamento de infecções. Assim, o uso de produtos naturais de conhecida atividade antimicrobiana pode adquirir significado nos tratamentos terapêuticos (LOGUERCIO *et al*, 2005).

1.9 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

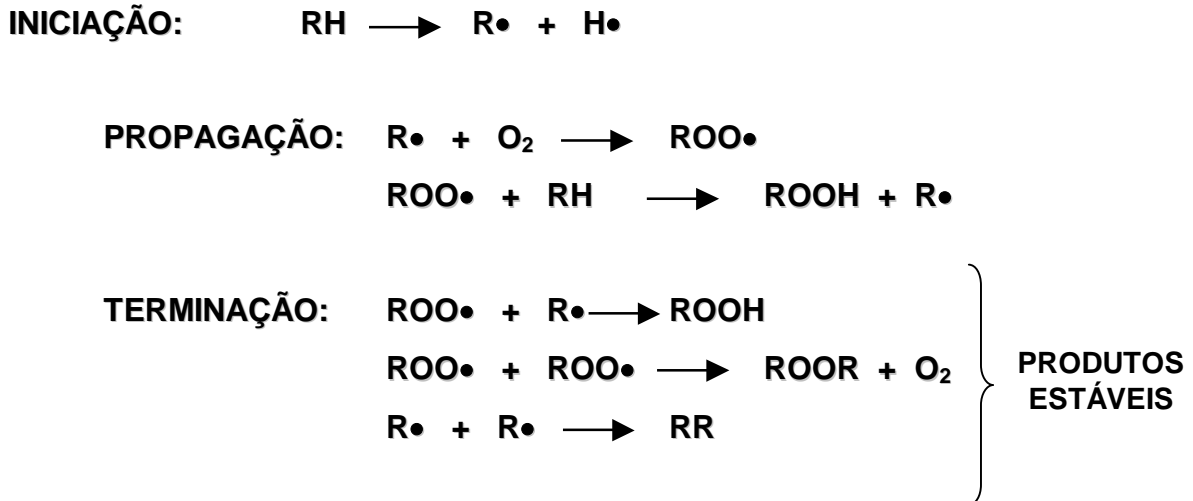
As células estão continuamente produzindo radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROs) como parte do processo metabólico. Estas espécies reativas são normalmente neutralizadas pelos sistemas antioxidantes presentes nos organismos. Assim, o estado de estresse oxidativo pode resultar tanto de um aumento na produção de EROs quanto da redução da capacidade antioxidante celular total que pode levar a danos moleculares às estruturas celulares, com consequente alteração funcional e prejuízo das funções vitais em diversos tecidos ou órgãos (HALLIWELL e CROSS, 1994). No entanto, o efeito deletério do estresse oxidativo varia consideravelmente de um ser vivo para o outro, de acordo com a idade, o estado fisiológico e a dieta (NIESS *et al*, 1999).

Um quadro gerado pela presença excessiva de EROs é a peroxidação lipídica, que pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultantes da ação de EROs sobre os lípidos insaturados das membranas celulares, gerando principalmente radical alquila, alcoxila e peroxila, o que leva à destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de troca de metabólitos e, numa condição extrema, à morte celular (BENZIE, 1996). As alterações nas membranas provocam o transtorno da permeabilidade e a alteração do fluxo iônico e o fluxo de outras substâncias. Isso resulta na perda da seletividade para entrada e/ou saída de nutrientes e substâncias tóxicas à célula, alterações do DNA, oxidação da LDL e

comprometimento dos componentes da matriz extracelular (proteoglicanos, colágeno e elastina) (VACA, WILHEM e HARMS-RINGDAHL, 1988).

O processo da peroxidação lipídica pode ser dividido em três etapas: iniciação, propagação e terminação (desenho 6). A fase de iniciação representa o início da peroxidação, em que o ácido graxo poli-insaturado sofre ataque de uma espécie que é suficientemente reativa para abstrair um átomo de hidrogênio a partir de um grupo metileno ($-\text{CH}_2^-$), formando um radical de carbono. Este radical é estabilizado por um rearranjo molecular para formar um dieno conjugado (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Em meio aeróbio, o radical alquila inicialmente formado se combina com o oxigênio formando o radical peroxila, que pode abstrair um hidrogênio alílico de um outro ácido graxo, gerando outro radical de carbono e promovendo a etapa de propagação. A reação do radical peroxila com o átomo de hidrogênio abstraído gera um hidroperóxido lipídico. Peróxidos cíclicos também podem ser formados quando o radical peroxila reage com uma dupla ligação na mesma cadeia de ácido graxo, o que também pode propagar a peroxidação lipídica (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

A terceira e última etapa da reação, a fase de terminação, dá-se pela aniquilação dos radicais formados, originando produtos não radicalares (GARDNER, 1989; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Os radicais peroxila e alcoxila também podem sofrer dismutação, ou clivagem formando aldeídos, ou uma ligação covalente com resíduos de aminoácidos, ou ainda sofrer um rearranjo compondo produtos secundários da peroxidação lipídica (derivados hidroxi-, ceto-, cetohidroxi- e epoxi-hidroxi-ácido graxo).



Desenho 6: Reações que ocorrem durante o processo de peroxidação lipídica de um ácido graxo poli-insaturado (RAMALHO e JORGE, 2006). RH = ácido graxo insaturado; R• = radical livre; Roo• = radical peróxido e ROOH = hidroperóxido.

1.10 - SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES

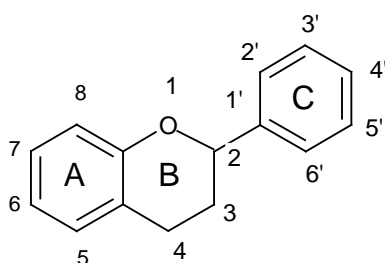
Os antioxidantes atuam em diferentes níveis na proteção dos organismos. O primeiro mecanismo de defesa contra os radicais livres é o impedimento de sua formação, principalmente pela inibição das reações em cadeia com o ferro e o cobre. São capazes de interceptar os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, impedindo o ataque sobre lipídeos, aminoácidos, dupla ligação dos ácidos graxos poli-insaturados e bases do DNA, evitando a formação de lesões e perda da integridade celular.

Os antioxidantes obtidos da dieta, tais como as vitaminas C, E e A, e os compostos fenólicos, como os flavonoides e carotenoides, são extremamente importantes na interceptação dos radicais livres. Outro mecanismo de proteção é o reparo das lesões causadas pelos radicais. Esse processo está relacionado com a remoção de danos da molécula de DNA e a reconstituição das membranas celulares danificadas. Em algumas situações pode ocorrer uma adaptação do organismo em resposta à geração desses radicais com o aumento da síntese de enzimas antioxidantes (BIANCHINI, 1999).

Os organismos eucariotos possuem enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase, a catalase e a glutathiona peroxidase, que reagem com os compostos oxidantes e protegem as células e os tecidos do estresse oxidativo (TRABER, 1997).

Dentre as diversas classes de substâncias antioxidantes de ocorrência natural, os compostos fenólicos têm recebido muita atenção nos últimos anos; isso se deve, principalmente, às suas propriedades redutoras e a sua estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, tanto na etapa de iniciação quanto na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (HASLAN, 1996; SOARES, 2002). Estes fenólicos são largamente distribuídos na natureza, encontrados geralmente em todo o reino vegetal e estão divididos em dois grandes grupos: os flavonoides e derivados e os ácidos fenólicos (ácidos benzoico, cinâmico e seus derivados).

Os flavonoides são os compostos mais diversificados do reino vegetal. Neste grupo encontram-se as antocianidinas, flavonas, os flavonóis e, com menor frequência, as auronas, chalconas e isoflavonas (SOARES, 2002). Possuem uma estrutura básica formada por C6-C3-C6, sendo que a atividade antioxidante de um flavonoide é determinada pelo anel B (desenho 7), enquanto que o restante da estrutura tem apenas uma pequena influência. Isso ocorre devido a uma maior capacidade eletroredutora desse anel, com uma maior influência do restante da estrutura base no decréscimo de atividade antioxidante do anel B.



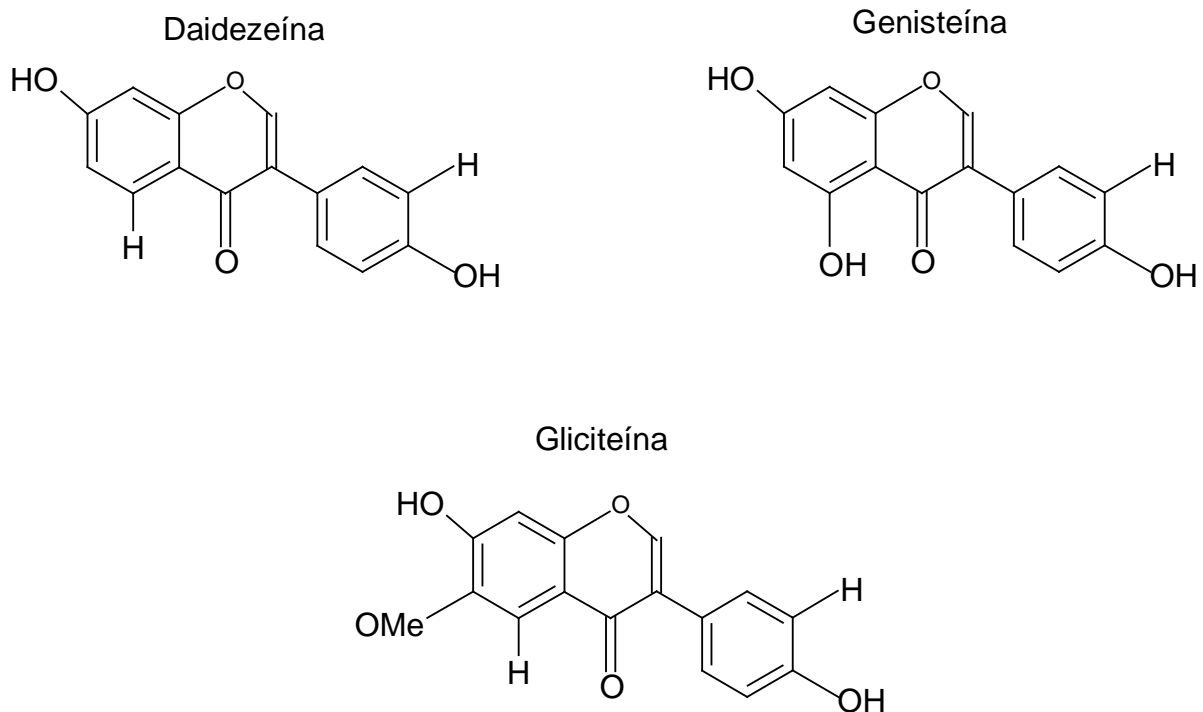
Desenho 7: Núcleo fundamental do flavonoide

A capacidade antioxidante dos flavonoides neutralizando os EROs previne a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), pois anula seus efeitos

negativos sobre as células. Eles têm capacidade de eliminar processos de peroxidação lipídica do ácido linoleico e fosfolípidos de membrana. Flavonoides, tais como, quercetina e campferol, são importantes no controle da concentração de glutathione pois, por atuarem ao nível do gene da regulação, são capazes de elevar sua concentração em 50%, induzindo o sistema antioxidante celular (MARTINEZ-FLORES, 2002).

Os isoflavonoides são uma das mais importantes classes que ocorrem naturalmente entre os flavonoides. São encontrados predominantemente na família Fabaceae. Os isoflavonoides são originados a partir das chalconas (REYNAUD *et al*, 2005).

Um dos exemplos mais conhecidos e que vem despertando interesses por sua propriedade biológica são as isoflavonas da soja (*Glycine max*) (VEITCH, 2007). Em humanos, estudos epidemiológicos mostram que compostos isoflavonólicos como a daidzeína, genisteína e gliciteína desempenham importante papel na prevenção de doenças cardiovasculares, osteoporose e câncer, além de serem considerados compostos antioxidantes (BRANDI, 1997) (desenho 8).



Desenho 8: Estruturas químicas dos principais isoflavonoides da soja.

1.11 - LETALIDADE PARA *Artemia salina*

A fim de estabelecer a toxicidade de novos produtos naturais, muitos ensaios podem ser utilizados. O ensaio de letalidade com *Artemia salina* foi desenvolvido para detectar compostos bioativos em extratos vegetais e expressar a toxicidade de produtos naturais (MEYER *et al*, 1982; NICK, RALI e STICHER, 1995; CARBALLO *et al*, 2002; RUIZ *et al*, 2005; LHULLIER, HORTA e FALKENBERG, 2006; SILVA *et al*, 2007, SHOEB *et al*, 2007; MOTA *et al*, 2008)

Artemia salina é um microcrustáceo marinho da subclasse dos Anostráceos, que apresenta de 8 a 13 mm de comprimento na forma adulta e, quando recém-eclodido do cisto, apenas uma fração de milímetros; esta forma é denominada náuplio. Em razão de suas reservas energéticas em meio adequado, ou seja, salinidade marinha correspondendo a 3,5 g% de NaCl a 28 °C, possui intensa atividade natatória, que se estende por mais de uma semana (fotografia 2).



Fotografia 2: *Artemia salina* utilizada para os ensaios de toxicidade (fonte: www.akvaristi.org/img_znanja/znanja_fil.html).

A avaliação da bioatividade de extratos de plantas, medida pela toxicidade frente *Artemia salina*, pode fornecer informações valiosas ao trabalho de químicos de produtos naturais e farmacólogos, indicando fontes vegetais com importantes atividades biológicas. Adicionalmente, alguns trabalhos mostram uma boa correlação

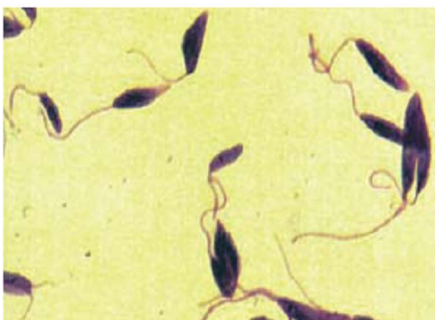
entre o ensaio de letalidade com larvas de *A. salina* e a citotoxicidade em linhagens de células tumorais (McLAUGHLIN *et al*, 1995; CARBALLO *et al*, 2002).

1.12 - ATIVIDADE LEISHMANICIDA

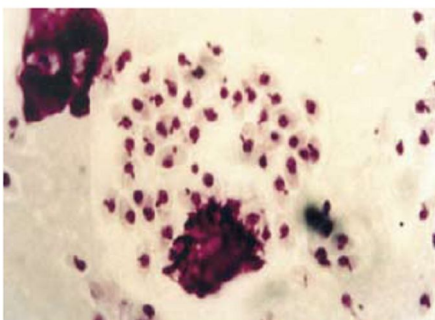
A leishmaniose é uma infecção parasitária determinada por espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. Possui alto impacto social e econômico e é a segunda maior incidência parasitária após a malária (LAINSON e SHAW, 1978), uma das seis parasitoses de maior importância mundial (BERMAN, 1998). Segundo a Organização Mundial da Saúde, a prevalência mundial é estimada em 12 milhões de indivíduos infectados e 350 milhões expostos ao risco de adquirirem a doença.

No Brasil, as leishmanioses ocorrem em quase todos os estados. O Ministério da Saúde registrou uma média anual de 35000 novos casos de leishmaniose tegumentar e 4000 de leishmaniose visceral (HABTERMARIAM, 1995).

Todas as espécies do gênero *Leishmania* são protozoários unicelulares, digenéticos e apresentam duas formas morfológicas: a promastigota, encontrada no trato digestivo dos hospedeiros invertebrados, e a amastigota, representada por parasito intracelular obrigatório do sistema fagocítico mononuclear dos hospedeiros vertebrados (NEVES *et al*, 1999) (fotografias 3 e 4).



Fotografia 3: Forma promastigota, flagelada de leishmania. (Fonte: Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana, 2007).



Fotografia 4: Forma amastigota, aflagelada de leishmania. (Fonte: Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana, 2007).

As drogas mais utilizadas no tratamento das leishmanioses são representadas pelos antimônios pentavalentes: antimônio de meglumina (glucantime) e o estibogluconato de sódio (pentostan); o mais utilizado no Brasil é o glucantime. São fármacos muito tóxicos, e muitos pacientes não respondem bem a estes tratamentos, porém continuam sendo usados em muitos países (BOGDAN *et al*, 1996). Outro medicamento usado é a anfotericina B, que é nefrotóxico e apresenta muitos efeitos colaterais, requerendo internação hospitalar do paciente na maioria das vezes, a fim de se administrar o medicamento (SUNDAR *et al*, 2001). No Brasil, o Ministério da Saúde registrou 14 mortes causadas pelo uso de antimoniais em 2000, e o número aumentou para 17 em 2001.

Rastrear espécies vegetais biologicamente ativas contra leishmanioses tem sido um dos grandes propósitos de determinados grupos de pesquisa em todo mundo. A observação das propriedades terapêuticas de produtos naturais tem levado à pesquisa dos princípios ativos de várias espécies vegetais. Metabólitos secundários, tais como alcaloides, terpenoides, flavonoides, considerados no passado como inativos, são hoje ferramentas importantes no tratamento e na investigação clínica para amenizar esta doença (WILLCOX *et al*, 2001).

Estudos químicos e imunofarmacológicos têm sido realizados com o intuito de se encontrar em novos compostos menos tóxicos, economicamente mais viáveis de efeito específico e que revertam a resistência do parasita às drogas. Dentre as numerosas plantas com potencial na modulação da resposta imune na leishmaniose, a *Kalanchoe pinata* tem demonstrado efeito sobre a redução das lesões em camundongos de linhagem susceptível pelo aumento da produção de óxido nítrico por macrófagos (BERGMANN *et al*, 1997). O efeito leishmanicida dos compostos isolados das espécies vegetais tem sido avaliado *in vitro* sobre formas promastigostas e/ou amastigota de *Leishmania*; dentre eles terpenoides de *Artemisia annua* (YANG *et al*, 1992), de *Peperomia galioides* (MAHIOU *et al*, 1995) e de *Guarea rhopalocarpa* (CAMACHO *et al*, 2000); aminoglicosteroides e aminosteroides de *Holarrhena curtisii* (KAM *et al*, 1997), naftoquinonas de *Pera benensis* (FOURNET *et al*, 1992; KAYSER *et al*, 2000), iridoides glicosídicos de *Picrorhiza kurroa* (MITTAL *et al*, 1998); flavonoides de *Centrolobium sclerophyllum* (ARAÚJO *et al*, 1998) e neolignanais de *Virola surinamensis* (BARATA *et al*, 2000).

2 - OBJETIVOS

2.1 - Objetivo geral:

Avaliar o potencial farmacológico e identificar as classes de constituintes químicos de *Senna macranthera* (Collad.) H. S. Irwin & Barney visando seu aproveitamento na terapêutica humana e/ou veterinária.

2.2 - Objetivos específicos

- 1- Identificar as classes de constituintes químicos de *S. macranthera*
- 2- Avaliar as seguintes atividades dos extratos de *S. macranthera*:
 - a) Antioxidante (DPPH e poder de redução)
 - b) Citotóxica por meio do ensaio com *Artemia salina*
 - c) Leishmanicida para as formas promastigotas de *L. chagasi* e *L. amazonensis*
 - d) Antimicrobiana para as cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Salmonella enterica* sorovar *typhimurium* (ATCC 13311), *Shigella sonnei* (ATCC 11060), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13866), *Escherichia coli* (ATCC 10536) e *Bacillus cereus* (ATCC 11778) e cepas de leveduras de *Cryptococcus neoformans* (ATCC 32608) e *Candida albicans* (ATCC 18804)
 - e) Laxativa
 - f) Sobre a motilidade intestinal
 - g) Anti-inflamatória no modelo edema de pata induzido por carragenina

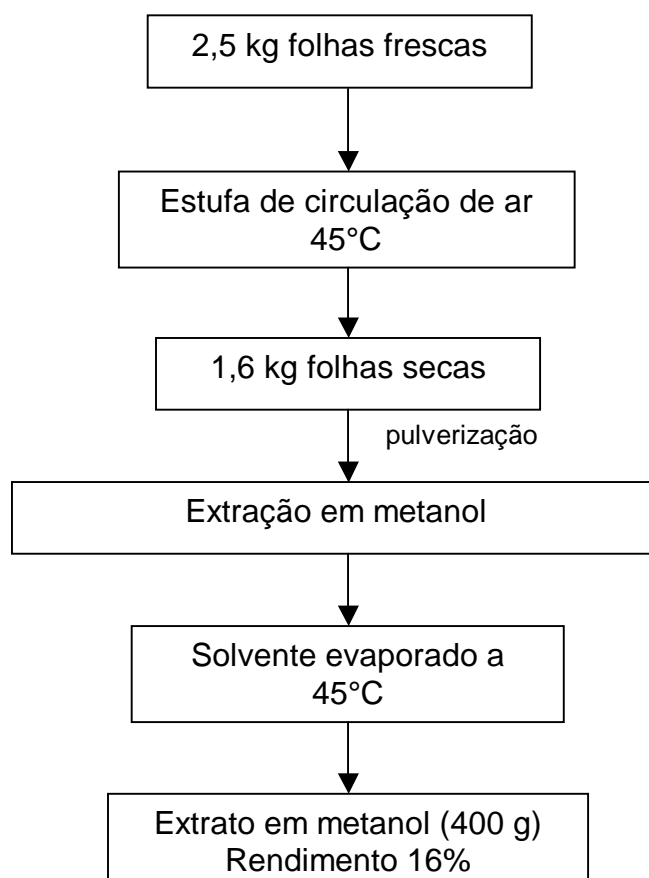
3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Coleta da planta e preparação dos extratos

3.1.1 - Material Vegetal

Foram coletados 2,5 kg das folhas de *S. macranthera* no mês de julho de 2007 no Campus Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). Uma exsicata foi depositada no Herbário Leopoldo Krieger/UFJF (CESJ 46159).

As folhas foram secas em estufa com circulação de ar a 45 °C, fornecendo 1,6 kg de material que foram pulverizados e extraídos por maceração estática com metanol até esgotamento. O extrato foi concentrado em evaporador rotatório a 45 °C até completa remoção do solvente. Foram obtidos 400 g (16%) de extrato bruto (desenho 9).



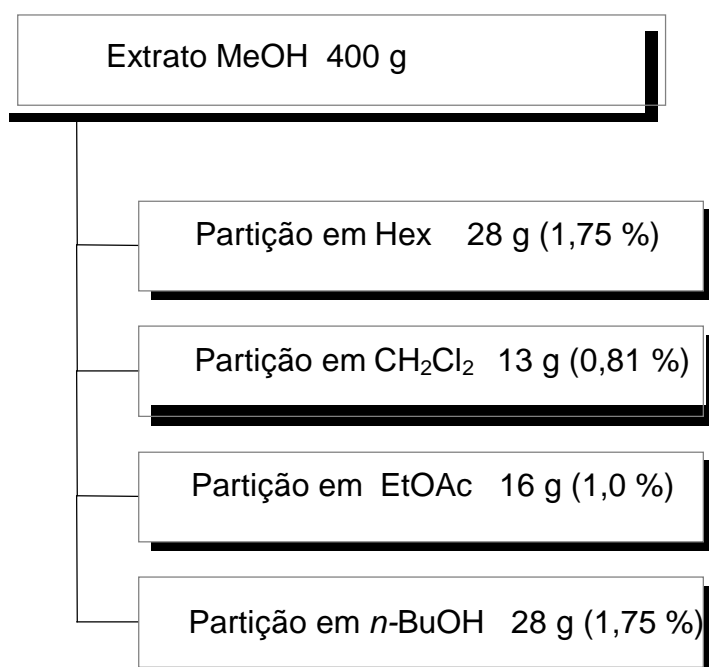
Desenho 9: Esquema do procedimento de preparo do extrato metanólico das folhas de *S. macranthera*.

3.1.2 – Preparo do extrato bruto de sene comercial

Duzentos gramas do pó das folhas de sene (Pharmacopea[®]) foram adquiridos em uma farmácia de manipulação, pesados e extraídos em MeOH até esgotamento. O extrato foi concentrado a 45 °C em evaporador rotatório até completa remoção do solvente. Foram obtidos 9 g (rendimento de 4,5%) de extrato bruto.

3.1.3 - Preparo das partições

O extrato em MeOH de *S. macranthera* foi ressuspenso em metanol:água destilada (8:2) e particionado com solventes de polaridades crescentes: hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol (5 X 200 ml). Os solventes foram evaporados utilizando-se evaporador rotatório (45 °C). As partições foram mantidas sobre refrigeração (4° C) até serem utilizadas nas análises fitoquímicas e biológicas (desenho 10).



Desenho 10: Esquema do particionamento líquido-líquido do extrato metanólico de *S. macranthera* utilizando-se solventes de polaridades diferentes.

3.2 - Estudo fitoquímico

3.2.1 - Triagem fitoquímica

As amostras (extrato e partições) foram submetidas às análises fitoquímicas preliminares para determinação das principais classes químicas de metabólitos especiais, de acordo com o protocolo descrito por Matos (1997), com algumas modificações.

3.2.2 - Preparo das amostras para identificação dos metabólitos especiais

Aproximadamente 100 mg de cada amostra foram solubilizados em MeOH e utilizados para identificação de alcaloides, triterpenoides, esteroides, saponinas, cumarinas, compostos fenólicos, taninos, flavonoides e antraquinonas livres e heterosídeos.

3.2.2.1- Alcaloides

Em uma placa de Elisa, 150 µl das amostras foram colocados em três poços diferentes e 50 µl de diferentes reagentes utilizados para identificação de alcaloides (Reativos de Hager, Mayer e Dragendorff) foram adicionados em cada poço. O aparecimento de precipitado branco com os reativos de Hager e Mayer e de cor alaranjada com o reativo de Dragendorff indica a presença de alcaloides.

3.2.2.2 – Triterpenoides e Esteroides

Em uma placa de Elisa, 150 µl das amostras foram colocados em um poço. Em seguida foi acrescentada uma gota de anidrido acético e duas gotas de ácido sulfúrico concentrado. O aparecimento de cor azul-esverdeada foi indicativo da presença de esteroides e de cor vermelha, da presença de triterpenoides.

3.2.2.3 - Saponinas

Em um tubo de ensaio foi colocado 1 ml das amostras e aproximadamente 2 ml da água destilada. O tubo foi agitado vigorosamente por 30 segundos e colocado em repouso por 20 segundos. A presença de espuma persistente com aproximadamente 1cm de altura indicou a presença de saponinas.

3.2.2.4 - Cumarinas

As amostras foram gotejadas em um pedaço de papel de filtro. Em seguida, uma gota da solução de KOH 5% em etanol foi adicionada a elas. O aparecimento de fluorescência de cor azulada analisada sob luz UV 365 nm indicou a presença de cumarinas.

3.2.2.5 - Compostos fenólicos

Em uma tira de papel de filtro as amostras foram gotejadas. Em seguida, uma gota da solução de FeCl_3 2% foi adicionada a elas. O aparecimento de uma mancha azul escura indica a presença de compostos fenólicos.

3.2.2.6 - Taninos

Em um tubo de ensaio foi colocado 1 ml das amostras e, gota a gota, foi acrescentada uma solução de gelatina 2,5%. O aparecimento de precipitado branco indicou a presença de taninos.

3.2.2.7- Flavonoides

Em uma tira de papel de filtro, a amostra foi gotejada seguida da adição de uma solução de AlCl_3 5% em etanol. O aparecimento de fluorescência de cor amarela analisada sob luz UV 365 nm indicou a presença de flavonoides.

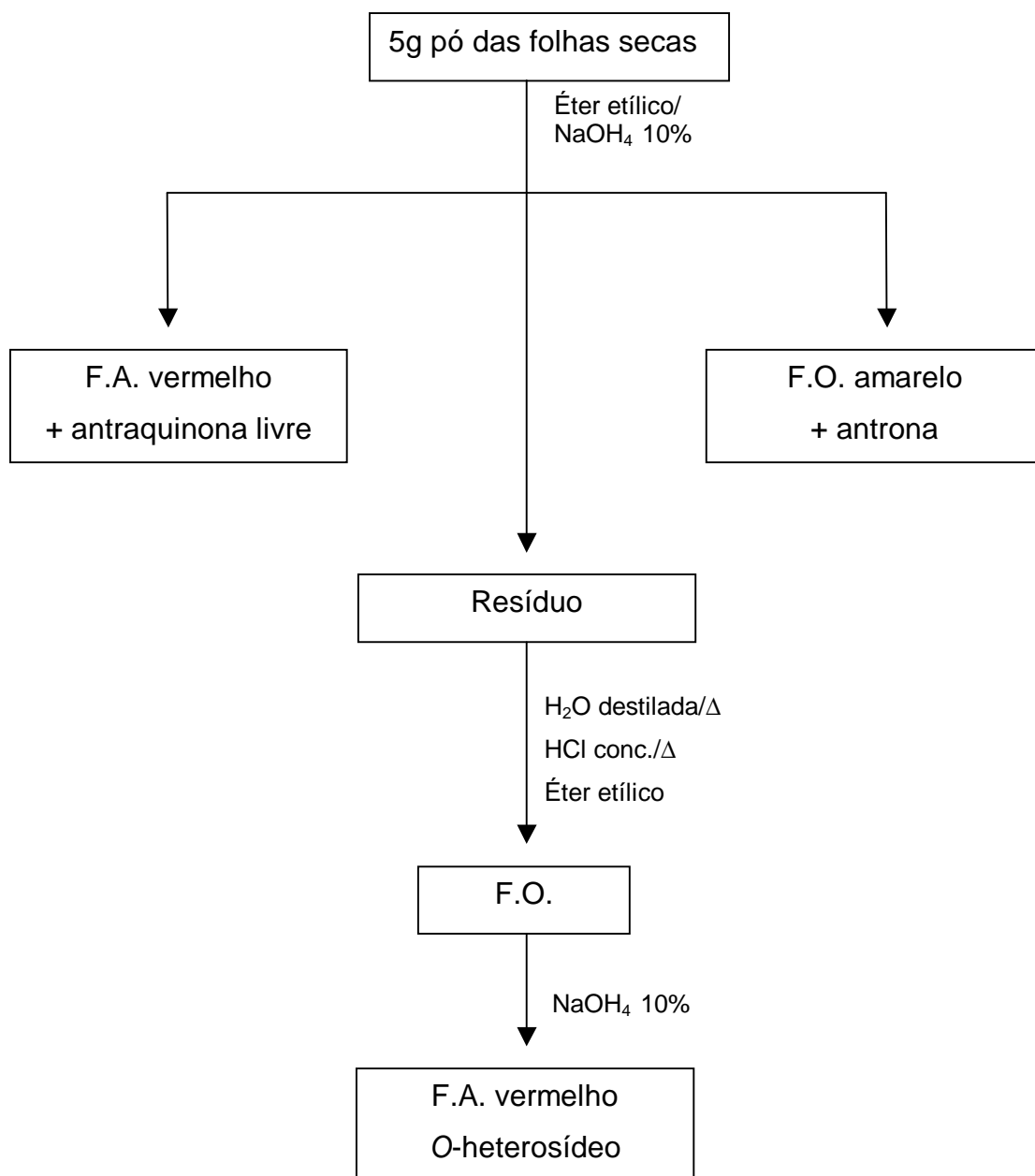
3.2.3 – Pesquisa de compostos antracênicos

Cinco gramas das folhas de *S. macranthera* e sene comercial foram extraídos com 20 ml de éter etílico. Após decantação, o sobrenadante foi transferido para um tubo de ensaio. O procedimento foi repetido novamente e os extratos etéreos reunidos. O resíduo foi reservado para a pesquisa de antraquinonas livres.

À solução etérea foi adicionado cerca de 1 ml de solução aquosa de NH_4OH a 10%. O aparecimento da coloração rósea ou vermelha na camada aquosa indica a presença de antraquinonas livres, e coloração amarelada na fase orgânica indica presença de antrons.

Ao resíduo foram adicionados 40 ml de água destilada. A mistura foi aquecida até fervura por 10 minutos e, posteriormente, foi resfriada e filtrada. Ao filtrado, adicionou-se 5 ml de HCl concentrado. A mistura foi novamente fervida por 10 min e após resfriada foi filtrada e extraída com éter etílico. O extrato etéreo foi alcalinizado com 2 ml de solução de NH_4OH a 10%. Uma coloração avermelhada na fase alcalina aquosa indica a presença de O-heterosídeos (desenho 11).

O mesmo procedimento foi realizado para o extrato metanólico e partição hexânica de *S. macranthera*.

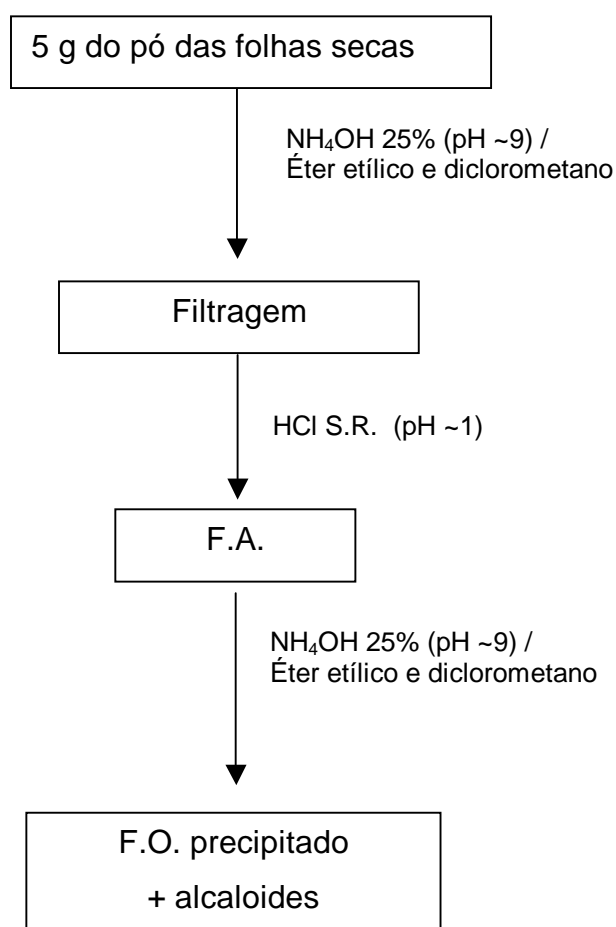


Desenho 11: Esquema do procedimento para identificação de compostos antracênicos nas folhas de *Senna macranthera* e sene comercial.

3.2.4 – Extração ácido-base de alcaloides

A extração de alcaloides foi realizada segundo protocolo descrito por Matos (1997), com algumas modificações. As folhas de *S. macranthera* foram secas e extraídas exaustivamente com hidróxido de amônio 25% e uma mistura de éter

etílico e diclorometano (3:1) por 2 h à temperatura ambiente. O extrato foi filtrado e solubilizado em solução reagente de ácido clorídrico (pH 1~2). A fase aquosa foi alcalinizada novamente com hidróxido de amônio 25% (pH 8~10) e extraída com a mistura de éter etílico e diclorometano. Todas as etapas foram monitoradas pelos reativos de Dragendorff, Mayer e Hanger (desenho 12). A presença de alcalóides é confirmada pela presença de um precipitado na fase aquosa.



Desenho 12: Esquema do procedimento de extração ácido-base de alcaloides nas folhas de *S. macranthera*.

3.2.5- Teor de flavonoides

O conteúdo de flavonoides foi determinado pelo método descrito por Miliauskas, Venskutonis e Van-BEEK (2004), com pequenas modificações.

Um mg de cada amostra foi ressuscitado em 1 ml de MeOH e misturado com 1 ml de uma solução de AlCl_3 2% em etanol e 1 gota de ácido acético glacial. O volume final foi completado com MeOH para 25 ml até uma concentração final de 40 $\mu\text{g/ml}$.

Para o branco, 1 ml da amostra foi ressuscitado em MeOH com 1 gota de ácido acético glacial. O volume final completado com MeOH para 25 ml.

Como referência foi utilizado 1 mg de rutina (Vetec), diluído em 1 ml de MeOH e misturado com 1 ml de uma solução de AlCl_3 2% em etanol e uma gota de ácido acético glacial. O volume final foi completado com MeOH para 25 ml. A curva de calibração foi construída nas concentrações de 40, 20, 10, 5, e 2 $\mu\text{g/ml}$. A absorvância foi medida a 415 nm em espectrofotômetro após 30 min de incubação a temperatura ambiente. Todas as determinações foram realizadas em triplicata. O conteúdo total de flavonoides foi expresso em mg/g de extrato vegetal, em equivalentes de rutina (ER).

3.2.6- Teor de fenóis totais

O conteúdo de compostos fenólicos totais nas amostras foi determinado pelo método de Folin-Denis (DUH e YEN, 1997).

Dois mg de extrato foram ressuscitados em 4 ml de EtOH (0,5 mg/ml). Um ml desta solução foi misturada com 1 ml do reagente de Folin-Denis e 8 ml de tampão Na_2CO_3 2% em NaOH 0,1N. A mistura foi agitada e após 60 min de incubação em banho-maria a 30 °C, foi centrifugada a 3000 g/min. A absorvância do sobrenadante foi medida a 730 nm em espectrofotômetro. Esta determinação foi realizada em triplicata e a média dos resultados foi utilizada para o cálculo do teor de compostos fenólicos.

O branco foi preparado com 1 ml de EtOH, 1 ml do reagente de Folin-Denis e 8 ml de tampão Na_2CO_3 em NaOH 0,1N.

A curva padrão foi construída com alíquotas de 100, 150, 200, 300, 400, 600 e 800 µl de solução de ácido tânico em EtOH (1 mg/ml). Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

O conteúdo de compostos fenólicos foi expresso em mg/g de extrato, em equivalentes de ácido tânico (EAT).

3.2.7 – Cromatografia em camada delgada – CCD

As cromatografias em camada delgada (CCD) foram efetuadas em cromatoplasmas de silicagel 60 F254 (Merck). Como fase móvel, foi utilizado diclorometano:metanol (99:1). A detecção dos compostos foi feita por pulverização com revelador com Liebermann-Burchard seguido de aquecimento em estufa a 110 °C por 5 min, para análise de compostos triterpenoides e esteroides e hidróxido de potássio 5% em etanol para identificação de compostos antracênicos.

3.2.8 – Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE

Para determinar os perfis cromatográficos das amostras foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE), Agilent Technologies 1200 Series com detector de arranjo de fotodiodos e injetor automático. Foi utilizada uma coluna de fase reversa (Zorbax SB-18; 25 cm X 4,6 cm X 5 µm). Como fase móvel, foi utilizado um gradiente crescente dos solventes (tabela 1); o fluxo foi 1 ml/min e o volume de injeção foi de 20 µl. A detecção foi feita no comprimento de onda de 270 nm.

O extrato em MeOH de sene comercial, o extrato em MeOH e as partições de *S. macranthera* foram dissolvidos na fase móvel inicial (1 mg/ml).

A emodina foi utilizada como substância de referência nas mesmas condições que as amostras, e observado seu espectro de absorção no ultravioleta.

Tabela 1: Esquema do gradiente utilizado para a realização da determinação do perfil cromatográfico das amostras.

Tempo (min)	Fase móvel A (água pH 3,8 com ácido fosfórico)	Fase móvel B (acetonitrila pH 3,8 com ácido fosfórico)
0-20	90	10
20-30	70	30
30-40	20	80

3.3 - ATIVIDADES BIOLÓGICAS *IN VITRO*

3.3.1 - Atividade antioxidante

3.3.1.1 - Teste com DPPH

O método de Brand-Williams (GOVINDARAJAN *et al*, 2003) tem por base a redução do radical 2,2'-difenil-1-picrihidrazilo (DPPH[•]), que apresenta um máximo de absorção a 517nm. O DPPH atua como um radical livre que possui um par de elétrons desemparelhados capaz de capturar um próton da substância antioxidante. Isso provoca a alteração na sua coloração de violeta para amarelo, levando a uma diminuição da absorvância, o que permite calcular, após o estabelecimento do equilíbrio da reação, a quantidade de antioxidante gasta para reduzir 50% do DPPH[•].

Soluções metanólicas das amostras nas concentrações de 62,5; 31,25; 15,63; 7,81; 3,91; 1,95; 0,98; e 0,49 µg/ml foram preparadas e adicionadas a 3 ml da solução de DPPH a 2%. Após um período de 30 minutos, na ausência de luz, foi realizada a leitura da absorvância das amostras e do branco (MeOH + DPPH) num espectrofotômetro a 517nm.

Foi calculado o CI₅₀, que é a concentração da amostra necessária para inibir em 50% a concentração inicial do DPPH (CHEVOLLEAU *et al*, 1992). Desta forma,

quanto menor o valor de Cl_{50} , maior a atividade antioxidante da amostra. Rutina e quercetina foram utilizadas como substâncias de referência.

3.3.1.2 - Poder de redução

O poder de redução das amostras foi determinado pelo método descrito por Oyaku (1986). Dois mg de cada amostra diluídos em 2 ml de água destilada foram misturados com 2,5 ml de tampão fosfato de potássio 200 μ M, pH 6,6 e 2,5 ml de ferricianeto de potássio 1 % [$K_3Fe(CN)_6$]. A mistura foi mantida em banho-maria a 50 °C por 20 minutos. Uma alíquota de 2,5 ml de ácido tricloroacético 10% foi adicionada à mistura, que foi centrifugada a 3000 g/min. A camada superior foi retirada e misturada com 2,5 ml de água destilada e 0,5 ml de $FeCl_3$ 0,1% e a absorbância foi mensurada a 700 nm em espectrofotômetro. L(+) ácido ascórbico foi utilizado como substância de referência. Todos os testes foram realizados em triplicata.

3.3.2 - Atividade citotóxica

A presença de constituintes citotóxicos foi avaliada utilizando-se a metodologia proposta por Meyer *et al* (1982) e modificada por Afonso-Neto (2003). Larvas de *Artemia salina* (náuplios), obtidas a partir de ovos utilizados como ração para peixes ornamentais (TROPFISH®), foram colocadas para eclodir em aquário com água do mar artificial arejada durante 48 h. As amostras foram testadas nas concentrações que variaram de 1000; 100 e 10 ppm e foram solubilizadas na água do mar artificial com a ajuda de um diluente (DMSO a 3%). Os testes foram realizados em tubos de ensaio com 10 náuplios, preenchidos com 4,5 ml de água do mar artificial e 0,5 ml do material a ser avaliado. Os tratamentos e o controle (água do mar artificial, com ou sem diluente) foram realizados em triplicata. Após 24 h foram contados os indivíduos vivos de cada tubo. Os resultados foram expressos em

CL₅₀ (concentração necessária para matar 50% dos náuplios). Timol foi utilizado como controle positivo e apresentou CL₅₀ = a 1,4 µg/ml

3.3.3- Atividade leishmanicida

Promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/Br/75/Josefa isoladas de um paciente com leishmaniose cutânea difusa) e *L. chagasi* (MHOM/Br/74/PP75 isoladas de um paciente com leishmaniose visceral) foram usadas para o ensaio *in vitro*. A atividade leishmanicida foi realizada de acordo com o método descrito por M'Bongo *et al* (1997). No ensaio da atividade antipromastigota, as formas promastigotas foram contadas na câmara de Neubauer. Os parasitas foram lançados à razão de 2 X 10⁶ células/ml de meio Warren com 10 % de SBF para *L. amazonensis* e 3 X 10⁶ células/ml de meio 199 com 10 % de SBF para *L. chagasi*, em uma placa de 96 poços.

As amostras testadas foram adicionadas após 1 hora em concentrações variadas. Os testes foram realizados em triplicata. Em três poços não ocorreu adição de amostras; estes foram o controle. Após três dias de incubação em estufa a 24 °C, foram adicionados 10 µl de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5 difenil tetrazólico (MTT; Sigma) (MOSSMAN, 1983) a 5 mg/ml em cada poço, e novamente incubados durante 4 h. A reação foi interrompida pela adição de 100 µl de isopropanol / ácido (100 ml de isopropanol / 0,4 ml de HCl 10 N) e lida em espectrofotômetro a 570 nm. A partir do teste de viabilidade, foi determinada a concentração inibitória (CI₅₀) de cada amostra, que representa a concentração molecular inibidora de 50% do crescimento celular. Anfotericina B foi usada como droga de referência, e o valor da concentração inibitória CI₅₀ foi de 0,9 µg/ml e 1,9 µg/ml para a forma promastigota de *L. amazonensis* e *L. chagasi*, respectivamente.

3.3.4 - Atividade antimicrobiana

As cepas padrão de bactérias usadas neste trabalho foram *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Salmonella enterica* sorovar *typhimurium* (ATCC 13311), *Shigella sonnei* (ATCC 11060), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13866), *Escherichia coli* (ATCC 10536) e *Bacillus cereus* (ATCC 11778) e as de fungo foram *Cryptococcus neoformans* (ATCC 32608) e *Candida albicans* (ATCC 18804)

O ensaio de susceptibilidade em microdiluição em caldo foi realizado usando-se o método descrito pela NCCLS para determinação do CIM (NCCLS, 2002). Todos os testes foram realizados utilizando-se caldo Mueller-Hinton (MHB) (Isofar) para bactérias e RPMI-1640 (Sigma) para fungos. Cepas de bactérias foram cultivadas “overnight” a 37 °C por 24 h em ágar Mueller Hinton, e as cepas de fungos a 35 °C por 48 h em ágar Sabouraud Dextrose.

Diluições sucessivas de 5,0 a 0,0046 mg/ml das amostras foram preparadas em microplacas de 96 poços. Para isso foram utilizadas soluções estoque de 25 mg/ml em DMSO 1%. Foram transferidos 160 µl dessa solução para o primeiro poço das microplacas, que já continha 200 µl de meio de cultura. Em seguida foram realizadas sucessivas diluições dos extratos, transferindo-se 180 µl do poço anterior para o poço posterior, que contém 180 µl de meio. Para completar o volume final de 200 µl, foram adicionados 20 µl de inóculo (10^8 unidades formadoras de colônias (CFU/ml), de acordo com a escala turbidimétrica padrão de McFarland). As placas foram incubadas a 37 °C por 24h para bactérias, e 35 °C por 48h para fungos. Os mesmos testes foram realizados simultaneamente com o crescimento do controle (MHB ou RPMI-1640 + microorganismo) e o controle negativo (MHB ou RPMI-1640 + extrato). Cloranfenicol (Feniclor®) foi usado como droga de referência para bactérias, e anfotericina B, como droga de referência para fungos com concentrações de 500 a 0,24 µg/ml. O CIM foi calculado como a menor diluição que apresenta completa inibição da cepa testada. Todos os testes foram realizados em duplicatas.

3.4 – ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS *IN VIVO*

3.4.1 – Animais

Utilizaram-se ratos Wistar machos, com 60 dias, pesando entre 200 e 230 g, provenientes do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da Universidade Federal de Juiz de Fora. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada de 23 ± 2 °C e umidade 45 – 55%, fotoperíodo de 12/12 h e livre acesso à água e à ração comercial (Nuvital™, Colombo, PR, BR).

3.4.2 - Motilidade intestinal

Para avaliação do trânsito intestinal, o extrato metanólico das folhas de *S. macranthera* e suas partições foram ressuspendidas em salina com 3% de DMSO na concentração de 400 mg/kg de animal e administradas em volume de 1ml. Os animais foram mantidos por um jejum de 12 horas para total esvaziamento gastrointestinal e divididos em nove grupos contendo sete ratos em cada um, como se segue:

- grupo I: atropina e.v. (controle negativo);
- grupo II: bisacodil v.o. 0,25 mg/kg (controle positivo);
- grupo III: solução salina v.o. (veículo);
- grupo IV: extrato em MeOH de sene comercial;
- grupo V: extrato MeOH de *S. macranthera*;
- grupo VI: partição em Hex;
- grupo VII: partição em CH₂Cl₂;
- grupo VIII: partição em EtOAc;
- grupo IX: partição em *n*-BuOH.

A atividade sobre o trânsito intestinal foi determinada segundo Janssen e Jageneau (1957) e Wong e Wai (1981). A administração via oral foi realizada por meio de gavagem. Após 40 min, os animais receberam a suspensão de carvão ativo 10% em solução de goma arábica 5% (1 ml/animal). Após 20 min, os ratos foram sacrificados e foi realizada a extirpação imediata do intestino desde o piloro até o início do ceco. O comprimento total do intestino delgado e a distância percorrida pela suspensão de carvão ativo foram medidos. O resultado foi expresso em porcentagem do comprimento total percorrido pelo carvão.

3.4.3 - Atividade laxativa

A avaliação da atividade laxativa foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Capasso *et al* (1986). O extrato metanólico das folhas de *S. macranthera* e as partições foram ressuspensas em solução salina com 3% de DMSO na concentração de 400 mg/kg de animal e administradas em volume de 1ml. Os animais foram mantidos em jejum por 8 h, porém com livre acesso à água.

Eles foram divididos em nove grupos contendo sete animais cada um, como a seguir:

- grupo I: atropina e.v. (controle negativo);
- grupo II: bisacodil v.o. 0,25 mg/Kg (controle positivo)
- grupo III: solução salina v.o. (veículo);
- grupo IV: extrato em MeOH de sene comercial;
- grupo V: extrato MeOH de *S. macranthera*;
- grupo VI: partição em Hex;
- grupo VII: partição em CH₂Cl₂;
- grupo VIII: partição em EtOAc;
- grupo IX: partição em *n*-BuOH.

Os animais receberam os extratos e imediatamente foram separados em caixas individuais para a coleta das fezes. Após oito horas de administração das amostras, as fezes foram coletadas. Em seguida, todos os animais receberam

alimentação e após oito horas, novamente as fezes foram coletadas, completando um ciclo de 24 horas.

3.4.4 – Atividade anti-inflamatória

Edema de pata induzido por carragenina

A avaliação da atividade anti-inflamatória foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Winter *et al*, (1962). O extrato metanólico das folhas de *S. macranthera* e as partições em Hex e MeOH foram ressuspensos em solução salina com 3% de DMSO na concentração de 400 mg/kg de animal e administradas em volume de 1ml. Os animais foram mantidos em jejum por 8 horas, porém com livre acesso à água.

Eles foram divididos em quatro grupos com sete animais em cada um, como se segue:

grupo I: solução salina v.o. (veículo);

grupo II: diclofenaco de sódio v.o. 10mg/kg (controle positivo)

grupo III: extrato MeOH;

grupo IV: partição em Hex;

Após 60 min da administração das amostras, os animais foram submetidos a uma injeção sub-plantar de 0,1 ml de carragenina 1% em solução salina 0,9% na pata traseira esquerda. O tamanho do edema da pata dos animais foi medido imediatamente com paquímetro após injeção de carragenina (tempo 0) e em intervalos de 60, 120, 180 e 240 min após administração do agente flogístico. A pata traseira direita foi utilizada como controle.

3.5 - Análise estatística

Os ensaios biológicos *in vitro* que foram realizados em triplicata tiveram os resultados apresentados como média \pm erro padrão (EP).

Para os ensaios farmacológicos *in vivo*, foram realizadas análises de variância (one-way ANOVA) e comparações múltiplas de Dunnett e Tukey a fim de se verificarem em quaisquer diferenças significativas. Utilizou-se o software Prismagraf e Sigmaplot. Diferenças entre as médias no nível de 5% ($P < 0,05$) foram consideradas significativas.

4 - RESULTADOS

4.1 - TRIAGEM FITOQUÍMICA

Os resultados da triagem fitoquímica do extrato metanólico e partições de *Senna macranthera* estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Triagem fitoquímica do extrato e partições de *Senna macranthera*

Constituintes químicos	MeOH	Hex	CH ₂ Cl ₂	EtOAc	<i>n</i> -BuOH
Fenóis	+	-	+	+	+
Flavonoides	+	-	+	+	+
Cumarinas	+	-	+	+	+
Saponinas	+	-	+	+	+
Taninos	+	-	-	+	+
Antraquinonas	-	-	-	-	-
Antronas	+	+	nr	nr	nr
Esteroides	-	+	-	-	-
Triterpenoides	+	+	+	+	+
Alcaloides	-	-	-	-	-

+ presença; - ausência; nr: não realizado

4.1.1 - Pesquisa de compostos antracênicos

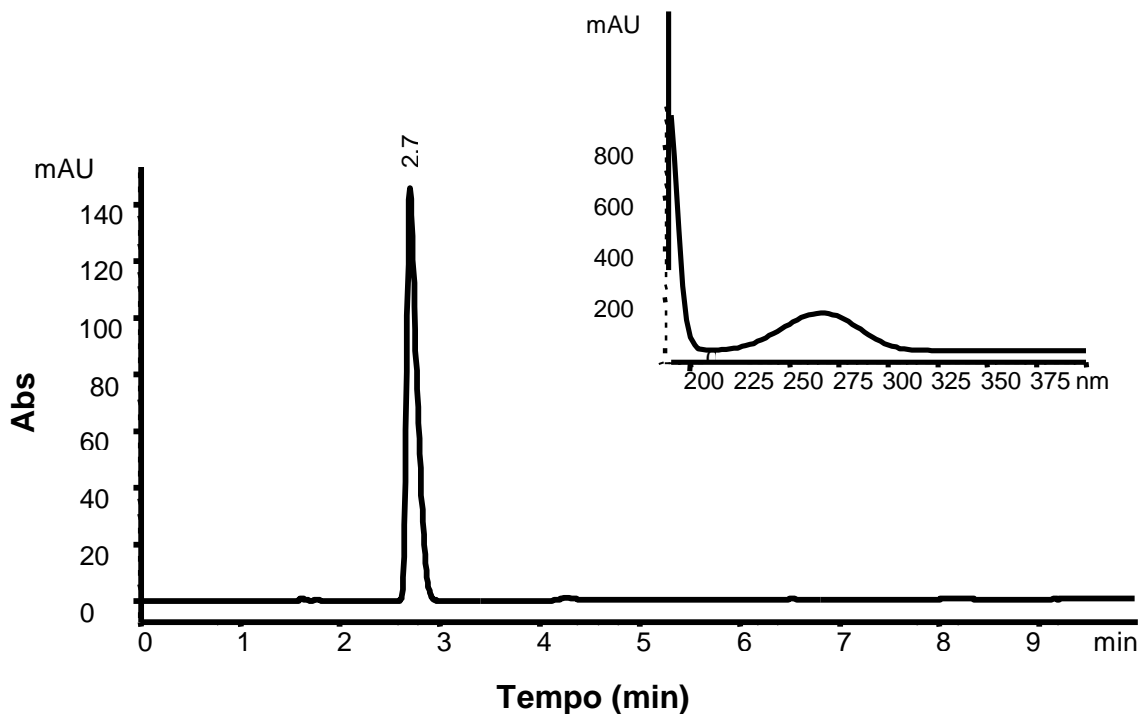
De acordo com os resultados obtidos, as folhas de *S. macranthera* apresentaram coloração amarelada na fase orgânica após adição de NaOH₄ 10%, o que significou presença de antronas na amostra. O sene comercial apresentou coloração avermelhada em ambas fases aquosas após adição de NaOH₄ 10%, determinando a presença de antraquinonas livres e *O*-heterosídeos.

4.1.2 - EXTRAÇÃO ÁCIDO-BASE DE ALCALOIDES

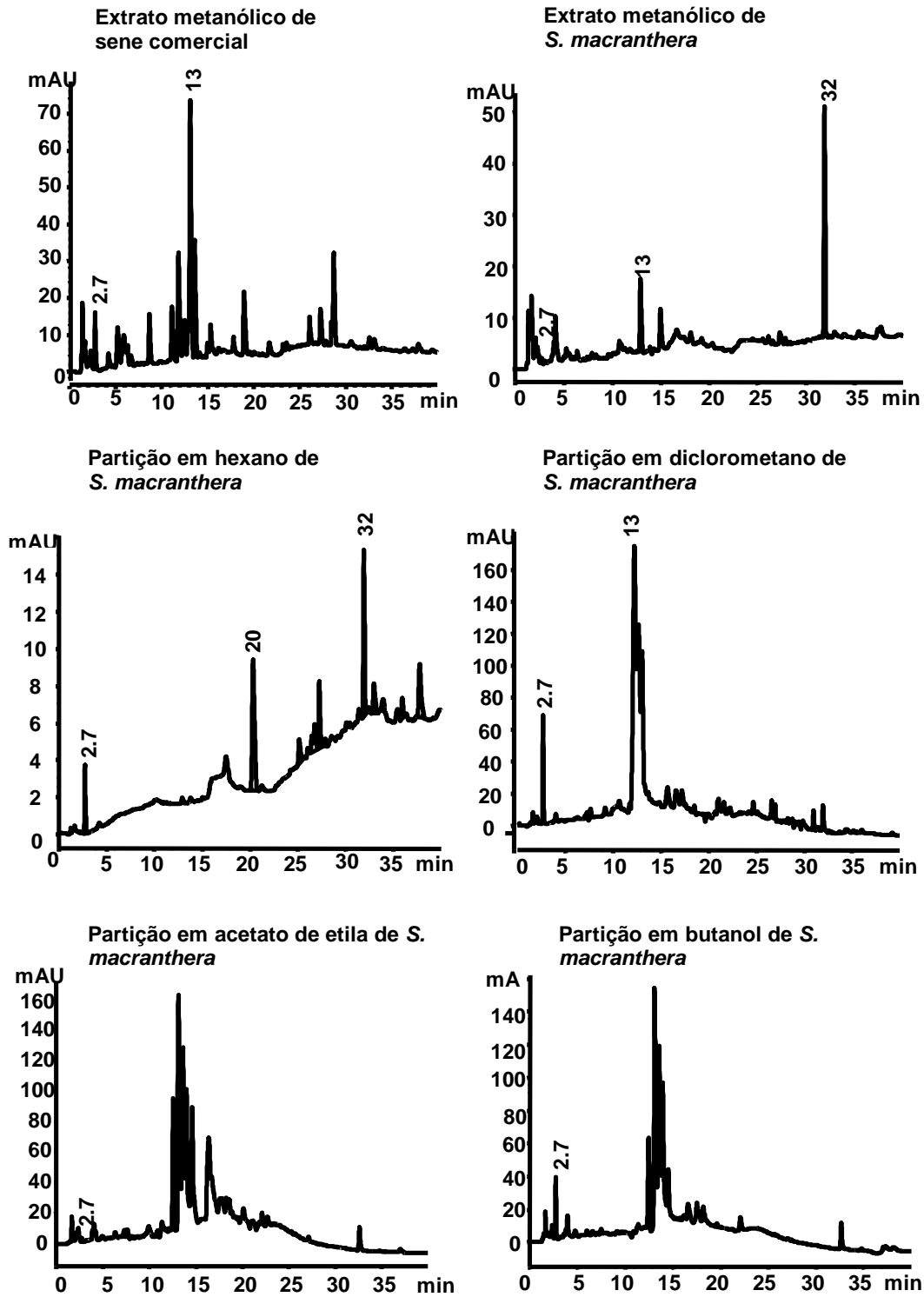
De acordo com os resultados obtidos, as folhas de *S. macranthera* não apresentaram alcalóides, pois não ocorreu a formação de um precipitado estável após a reação com os reativos de Mayer, Hager e Dragendorff.

4.1.3- PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTIDO POR CLAE

O cromatograma obtido por CLAE da emodina está apresentado no desenho 13. Já o desenho 14 mostra os cromatogramas do extrato e partições de *S. macranthera*.



Desenho 13: Cromatograma da substância de referência emodina com tempo de retenção 2,7min. No detalhe o espectro U.V da emodina.



Desenho 14: Cromatogramas obtidos por CLAE mostrando a presença de emodina (TR = 2,7min) nas diversas amostras. Detecção em 270 nm.

4.1.4 - TEOR DE FENÓIS TOTAIS E FLAVONOIDES

O teor de fenóis totais e de flavonoides estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Teor de fenóis totais e flavonoides do extrato e partições de *Senna macranthera*.

Extrato/ classes	Teor de fenóis em mg/g do extrato ^a	Teor de flavonoides em mg/g do extrato ^b
MeOH	270,4 ± 0,014	430,25 ± 0,007
Hexano	28,16 ± 0,015	55,0 ± 0,011
CH ₂ Cl ₂	382,0 ± 0,013	196,06 ± 0,024
EtOAc	547,0 ± 0,025	198,52 ± 0,0065
<i>n</i> -BuOH	395,8 ± 0,045	109,18 ± 0,004

^a Teor de fenóis totais expressos em equivalente de ácido tânico

^b Teor de flavonoides expressos em equivalente de rutina

4.1.5 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E PODER DE REDUÇÃO

Os resultados da atividade antioxidante e poder de redução estão demonstrados na tabela 4.

Tabela 4: Atividade antioxidante do extrato e partições de *Senna macranthera*

Extrato e partições	DPPH CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$) ^a	Poder de redução CE_{50} ($\mu\text{g/ml}$) ^a
MeOH	11,47 \pm 1,890	29,18 \pm 0,517
Hex	59,12 \pm 2,258	88,64 \pm 3,514
CH ₂ Cl ₂	23,38 \pm 2,426	46,64 \pm 10,22
EtOAc	4,26 \pm 3,172	7,68 \pm 0,969
<i>n</i> -BuOH	39,47 \pm 2,219	24,79 \pm 0,124
Rutina	2,5 \pm 0,112	
Quercetina	0,931 \pm 0,068	
Ácido ascórbico		1,80 \pm 0,480

^a média das medidas realizadas em triplicata \pm erro padrão

4.2 - ENSAIOS BIOLÓGICOS *IN VITRO*

4.2.1 - Atividade citotóxica e leishmanicida

O extrato metanólico e as partições de *S. macranthera* não apresentaram toxidez no teste com *Artemia salina* ($CI_{50} > 1000 \mu\text{g/ml}$). Também não demonstraram atividade leishmanicida ($CI_{50} > 250 \mu\text{g/ml}$) para as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *L. chagasi*.

4.2.2 - Atividade antimicrobiana

Os resultados referentes à atividade antimicrobiana do extrato metanólico e das partições de *S. macranthera* estão demonstrados na tabela 5:

Tabela 5: Atividade antimicrobiana do extrato e partições de *S. macranthera*.

Microorganismos ^a	Extratos (mg/ml) ^b						Controles Positivos (µg/ml)
	MeOH	Hex	CH ₂ Cl ₂	EtOAc	<i>n</i> -BuOH	Cloranfenicol	Anfotericina B
BC	2,5	2,5	1,25	0,62	1,25	3,9	
EC	5	5	5	5	5	15,6	
KP	5	5	5	5	5	0,98	
PA	0,078	0,02	0,62	1,25	2,5	15,6	
ST	5	5	5	5	5	0,98	
SS	5	5	5	2,5	5	0,98	
SA	2,5	0,62	2,5	5	2,5	62,5	
CA	5	5	2,5	2,5	2,5		0,39
CN	5	5	5	5	5		0,78

^aBC: *Bacillus cereus*; EC: *Escherichia coli*; KP: *Klebsiella pneumoniae*; PA: *Pseudomonas aeruginosa*; ST: *Salmonella typhimurium*; SS: *Shigella sonnei*; SA: *Staphylococcus aureus*; CA: *Candida albicans*; CN: *Cryptococcus neoformans*

^b MeOH: extrato metanólico de *S. macranthera*; Hex: partição em hexano de *S. macranthera*; CH₂Cl₂: partição em diclorometano de *S. macranthera*; EtOAc: partição em acetato de etila de *S. macranthera*; *n*-BuOH: partição em butanol de *S. macranthera*.

4.3 - ATIVIDADE FARMACOLÓGICA *IN VIVO*

4.3.1 - Atividade laxativa

Os resultados referentes à atividade laxativa do extrato metanólico e as partições de *S. macranthera* após 8 e 16 horas do tratamento estão demonstrados nos gráficos 1 e 2, respectivamente.

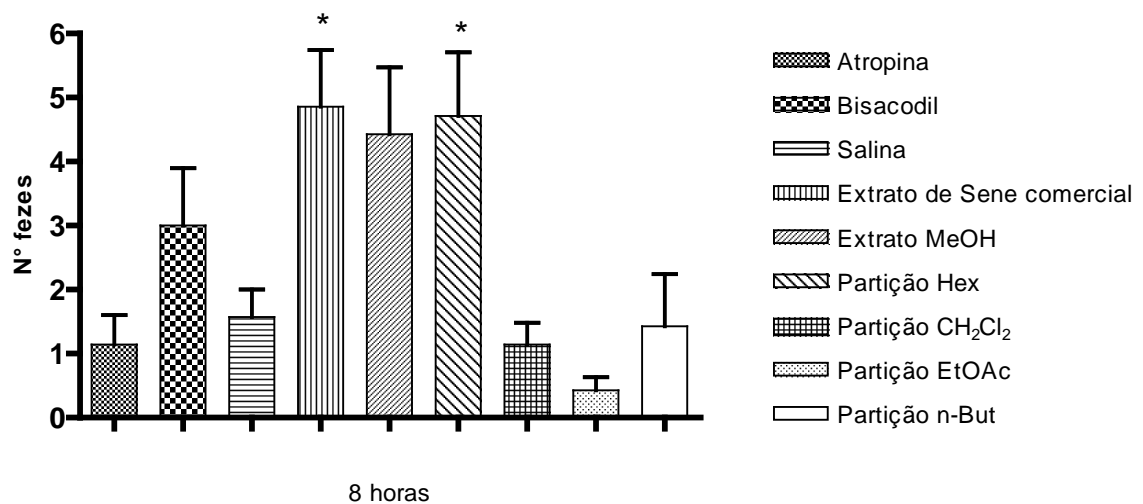


Gráfico 1 – Efeito laxativo do extrato e partições de *S. macranthera*, extrato de sene comercial (400 mg/kg/v.o.), atropina (1 mg/kg/i.v.), Bisacodil (5 mg/kg/v.o.) e salina por via oral, durante período de 8 horas após administração das amostras em ratos Wistar albinos. N = 7/grupo, * p<0,05.

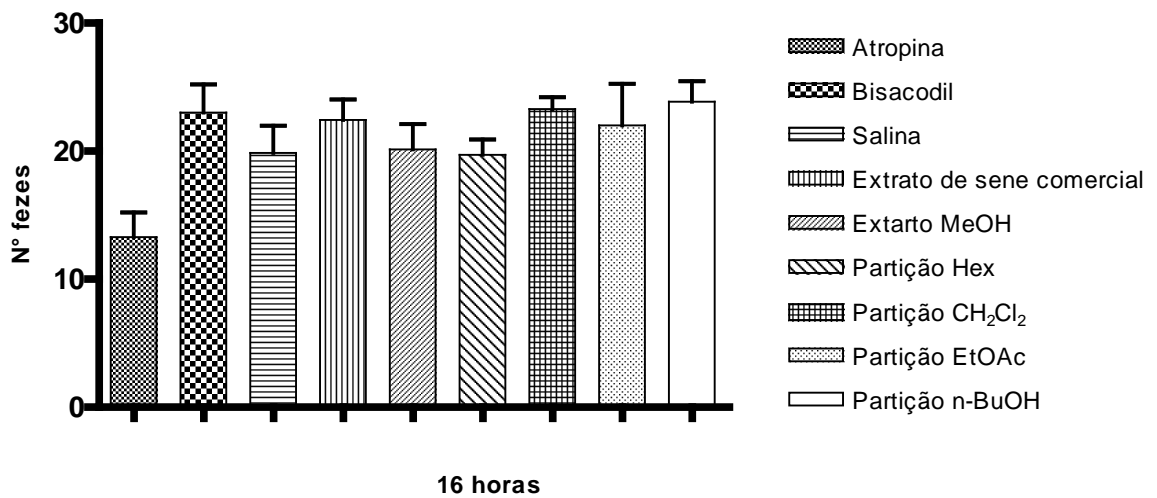


Gráfico 2: Efeito laxativo do extrato metanólico e partições de *S. macranthera*, do extrato de sene comercial (400 mg/kg/v.o.), atropina (1 mg/ml/ e.v.), bisacodil (5 mg/kg/v.o.) e salina (veículo/ v.o.), durante período de 16 horas após administração das amostras em ratos Wistar albinos e com livre acesso à comida e à água. N = 7/grupo, * p<0,05.

4.3.2 - Motilidade intestinal

O resultado da motilidade intestinal, descrita como sendo a distância percorrida pelo carvão ativo no intestino de ratos, sob a influência de diferentes tratamentos está demonstrado no gráfico 3:

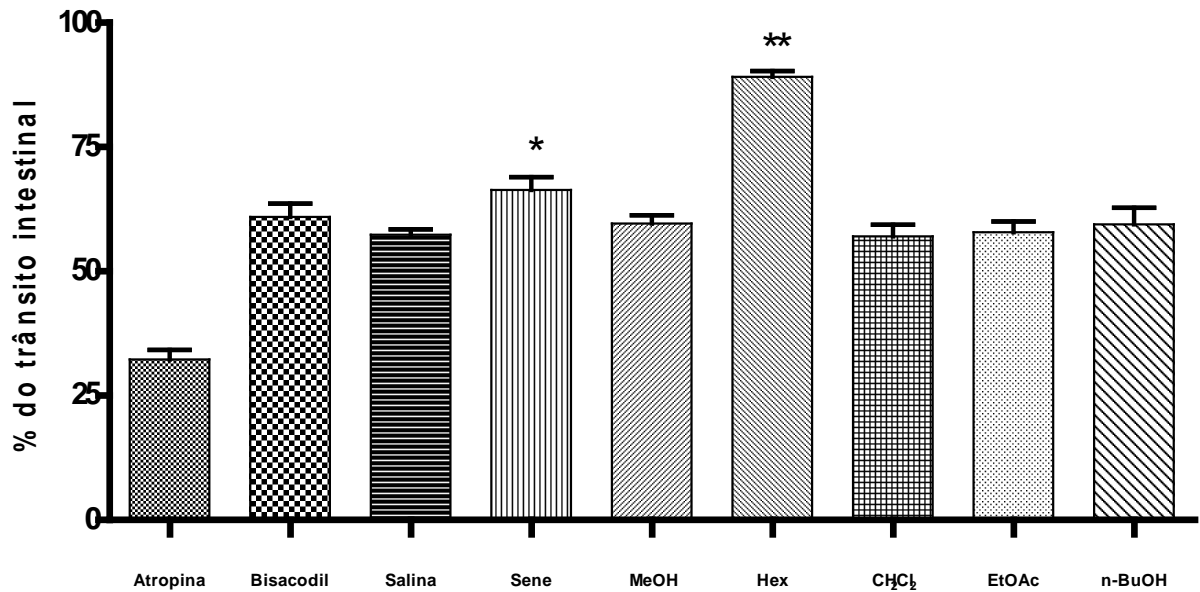


Gráfico 3: Distância percorrida pelo marcador (carvão) no intestino delgado de ratos nos diversos grupos experimentais. N = 7/grupo, * $p < 0,01$ e ** $p < 0,05$. Atropina 1mg/ml e.v.; bisacodil 5mg/kg de animal; extrato metanólico e partições de *S. macranthera* e sene comercial (400 mg/kg/v.o.). Legenda: Sene (extrato de sene comercial); MeOH (extrato metanólico de *S. macranthera*); Hex (partição em hexano); CH₂Cl₂ (partição em diclorometano); EtOAc (partição em acetato de etila); n-BuOH (partição em butanol).

4.3.3 - Atividade anti-inflamatória

O efeito anti-inflamatório dos extratos de *S. macranthera* avaliado pelo método do edema de pata induzido por carragenina é mostrado no gráfico 4 e na tabela 6.

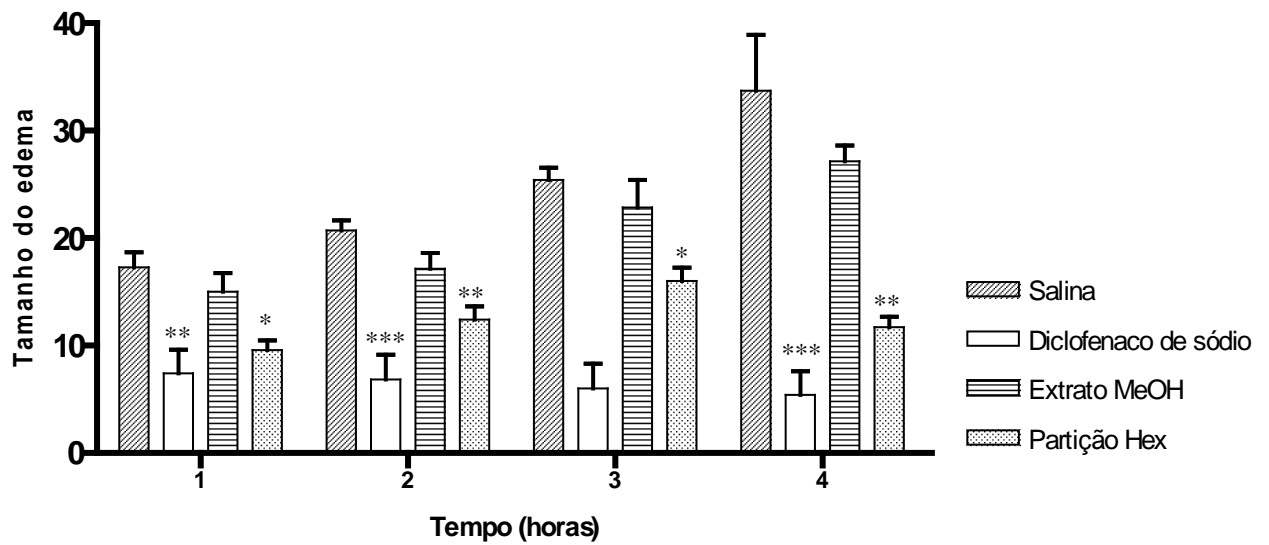


Gráfico 4: Efeito do extrato metanólico e partição em hexano de *S. macranthera* (400 mg/Kg/v.o) sobre o edema de pata induzido por carragenina (1% em solução salina/sub-plantar) durante 4 horas de experimento. Controle positivo diclofenaco de sódio (10mg/kg/ v.o.), N = 7/grupo, *p<0,05; **p<0,01 e ***p<0,001

Tabela 6: Porcentagem de inibição do edema de pata induzido por carragenina (n = 7) do extrato bruto e partição em hexano de *S. macranthera*.

Grupos experimentais	Dose	1ª hora	2ª hora	3ª hora	4ª hora
Diclofenaco de sódio	10 mg/kg	56%	65%	76%	75%
Ext.MeOH ^a	400mg/kg	6%	17%	12%	7%
Part. Hex ^b	400mg/kg	47%	40%	38%	58%

^a = MeOH: extrato metanólico de *S. macranthera*

^b = Hex: partição em hexano de *S. macranthera*

5 - DISCUSSÃO

5.1 - CONSTITUIÇÃO QUÍMICA DO EXTRATO E PARTIÇÕES DE *Senna macranthera*

A prospecção química tem como objetivo conhecer os constituintes químicos presentes em extratos vegetais e se torna bastante importante quando não se dispõe de estudos químicos sobre a espécie de interesse. No estudo fitoquímico do extrato metanólico e partições de *S. macranthera*, pôde-se constatar a presença de substâncias fenólicas e triterpenos em todas as amostras, com exceção da partição em hexano, na qual só foram evidenciados antronas, esteroides e triterpenoides (tabela 2). A presença desses 2 últimos constituintes foi confirmada em análise posterior por CCD, utilizando-se reativo de Liebermann-Burchard como revelador. O aparecimento de manchas arroxeadas com Rf de 0,3 e 0,5 caracterizou a presença de triterpenoides, e de manchas esverdeadas com Rf de 0,35 e 0,65 e 0,95, de esteroides. Representantes dessas classes, como os esteroides β -sitosterol e estigmasterol e os triterpenos α e β amirina, foram isolados de uma outra espécie de *Senna*, conhecida por *S. reticulata* (SANTOS e SILVA, 2008).

Apesar de os alcaloides piperidínicos terem sido anteriormente identificados em algumas espécies de *Senna* (VIEGAS *et al*, 2004, 2006 2007), as reações de Dragendorff, Mayer e Hager utilizadas nesse estudo para detecção deles apresentaram resultado negativo para todos os extratos de *S. macranthera* (tabela 2).

Espécies do gênero *Senna* são notoriamente conhecidas por possuírem compostos antracênicos, como antraquinonas, antronas, antranóis, diantronas e outros. As antraquinonas constituem o grupo mais numeroso das quinonas naturais, apresentam significativas atividades biológicas e sua ocorrência tem sido relatada em quase todas as espécies de *Senna* estudadas. Apresentam-se geralmente como substâncias cristalinas de cor amarela, vermelha ou laranja e estão distribuídas largamente no reino vegetal, desde as plantas superiores até aos fungos e líquens (VAN GORDON *et al*, 1999).

Nas folhas de *S. macranthera* não foi possível detectar a presença de antraquinonas pelo método utilizado (Reação de Borntraeger). Dessa forma,

procedeu-se a uma investigação mais apurada para detecção de outros compostos antracênicos. Foi verificada a presença de antronas no extrato metanólico e na partição em hexano, pelo aparecimento de intensa coloração amarela na fase etérea. Esse resultado foi confirmado por CCD, utilizando-se solução de KOH 5% em etanol como revelador. Foi observada uma mancha de coloração amarelo intenso com Rf de 0,75.

Apesar de as antraquinonas não terem sido observadas pela reação de Borntraeger, a análise das amostras por CLAE permitiu identificar a presença da antraquinona emodina (desenho 13) nas amostras de *S. macranthera* (desenho 14). Provavelmente ela se encontra em concentrações abaixo do limite de detecção da reação em foco. As partições em diclorometano e em butanol apresentaram uma concentração de emodina maior do que a detectada no extrato de sene comercial.

Tendo em vista a presença de substâncias fenólicas em todas as amostras estudadas, procedeu-se à quantificação de fenólicos totais e de flavonoides. Com exceção da partição em hexano, as demais apresentaram elevada concentração desses compostos, porém não foi observada uma correlação positiva entre os teores de fenólicos e de flavonoides (tabela 3).

Vários métodos espectrofotométricos para quantificação de compostos fenólicos em extratos vegetais têm sido desenvolvidos (ANGELO e JORGE, 2007). O método de Folin-Denis é um dos mais utilizados para a determinação de fenólicos totais em vegetais (NACZK e SHAHIDI, 2004). Este método descrito por Swain e Hills (1959) baseia-se na redução do ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico pelas hidroxilas fenólicas, produzindo um complexo de coloração azul que absorve entre 620 e 740 nm com um comprimento de onda máximo em 725 nm. A reação ocorre em meio alcalino e a solução saturada de carbonato de sódio é a base mais indicada. O número de grupos hidroxilas ou de grupos potencialmente oxidáveis controla a quantidade de cor formada. O grupo fenólico deve estar na forma de fenolato para os ânions molibdo e tungstofosfato produzirem a oxidação. As moléculas reduzidas são azuis e as não reduzidas são amarelas. Estas últimas se decompõem vagarosamente em pH alcalino, que é necessário para a manutenção do fenol na forma de fenolato (SHAHIDI e NACZK, 1995).

A utilização de métodos espectrofotométricos para a determinação de flavonoides totais em plantas também já foi proposta, utilizando-se AlCl_3 (SCHMIDT e ORTEGA, 1993). O cátion alumínio forma complexos estáveis com os flavonoides

em metanol, ocorrendo na análise espectrofotométrica um desvio para maiores comprimentos de onda e uma intensificação da absorção. Dessa maneira, é possível determinar a quantidade de flavonoides, evitando-se a interferência de outras substâncias fenólicas, principalmente os ácidos fenólicos, que invariavelmente acompanham os flavonoides nos tecidos vegetais. A leitura é feita em espectrofotômetro a 425 nm (WOISKY, 1996). Nessas condições, o complexo flavonoide-Al absorve em comprimento de onda bem maior do que aquele sem a presença do agente complexante.

5.2 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Sistemas enzimáticos importantes para a manutenção do organismo também têm a capacidade de produzir substâncias indesejáveis que, ao fim de um longo período, são capazes de promover danos aos tecidos causando perda das funções fisiológicas, doenças e até morte (SORG, 2004). Substâncias antioxidantes têm a capacidade de inibir as enzimas como a ciclo-oxigenase, xantina-oxidase, lipo-oxigenase, mono-oxigenase microsomal, glutathione-S-transferase, succinoxidase mitocondrial e NADH oxidase responsáveis pela formação de radicais livres (PIETTA, 2000).

Dessa forma, o potencial antioxidante das amostras de *S. macranthera* foi avaliado de acordo com sua capacidade sequestradora de elétrons (método do DPPH) e seu potencial de redução.

Os extratos em MeOH e partição em EtOAc apresentaram significativo aumento na capacidade sequestradora do radical DPPH. Quanto maior o consumo de DPPH pela amostra, menor sua concentração inibitória (CI₅₀) e maior será sua atividade antioxidante.

Geralmente substâncias com potencial antioxidante reagem com DPPH, que é um radical nitrogenado com absorção característica em 517nm e convertem em 1,1-difenil-2-picrilhidrazina, devido à sua capacidade de doar prótons. Acredita-se que substâncias antioxidantes conseguem interceptar a oxidação de radicais livres pela doação de hidrogênio da hidroxila presentes em compostos fenólicos, formando um produto final estável, que não propaga mais reações de oxidação

(JAYAPRAKASHA e PATIL, 2007). O teste que utiliza o radical estável DPPH mede a capacidade das substâncias testadas em doar hidrogênio radicalar a esse radical; assim, quanto maior o número de hidroxilas presentes na amostra, maior sua atividade antioxidante. A estabilidade do radical formado é outro fator que influencia no potencial antioxidante, sendo maior nas substâncias que possuem maior capacidade de deslocalizar o radical pela estrutura (DUARTE-ALMEIDA, 2006)

A capacidade de redução do Fe^{3+} para Fe^{2+} também foi expressiva para a partição em acetato de etila que apresentou EC_{50} mais próximo ao ácido ascórbico, utilizado como referência por ser um potente agente redutor (tabela 4).

Compostos fenólicos de plantas se enquadram em diversas categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácido benzoico e cinâmico), cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisados, lignanas e ligninas (NACZK e SHAHIDI, 2004). Dentre as diversas classes de substâncias antioxidantes de ocorrência natural, os compostos fenólicos têm recebido muita atenção, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica e lipooxigenase (HASLAN, 1996; SOARES, 2002).

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos deve-se, principalmente, às suas propriedades redutoras e à sua estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação quanto na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura dessas substâncias (HASLAN, 1996; SOARES, 2002; CHUNN *et al*, 2005).

De modo geral, os polifenóis em particular os flavonoides, possuem estrutura ideal para o sequestro de radicais, sendo algumas vezes, antioxidantes mais efetivos que a vitamina C e E. Quanto maior o número de hidroxilas, maior a atividade como agente doador de H^+ e elétrons. Flavonoides monohidroxilados apresentam atividade muito baixa: por exemplo, a 5-hidroxi-flavona tem atividade não detectável (CAO, SOFIC, e PRIOR, 1997). A glicosilação reduz a atividade antioxidante, no entanto, aumenta a solubilidade em água, o que permite seu armazenamento nos vacúolos da célula.

Dessa forma, provavelmente, os flavonoides encontrados no extrato metanólico de *S. macranthera* são glicosilados, visto que foram extraídos em grande

quantidade em metanol (tabela 3). Além disso, pode se tratar de isoflavonoides, que estão presentes no gênero *Senna* e são uma classe importante entre os flavonoides. A pronunciada atividade antioxidante da partição em acetato de etila (tabela 4) deve-se principalmente a outros compostos fenólicos que não os flavonoides.

Os resultados apresentados neste trabalho estimulam a continuidade dos estudos para se identificar em substâncias antioxidantes presentes em *S. macranthera*.

5.3 - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Segundo Rios e Recio (2001), extratos que apresentam CIM $\leq 0,1$ mg/ml são considerados ativos e, dessa forma, promissores para estudos posteriores. Assim, o extrato metanólico de *S. macranthera* e a partição em hexano apresentaram atividade pronunciada e seletiva para *P. aeruginosa* (CIM = 0,078 e 0,02 mg/ml, respectivamente). Porém, para os demais microorganismos, as amostras testadas não apresentaram atividade significativa (tabela 5).

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo gram-negativo não fermentador de glicose que pode ser isolado do solo, água, plantas e mesmo animais – incluídos aí os seres humanos (GALES *et al*, 2001). Fatores como a habilidade de utilizar uma grande variedade de substratos como fontes de carbonos, a excepcional capacidade de colonizar nichos ecológicos diversos (nos quais a oferta de nutrientes é limitada) e a capacidade de sobreviver por longos períodos em ambientes úmidos contribuem para sua característica de ser altamente resistente em ambientes adversos. Por isso, é considerada como um patógeno oportunista (POLLACK, 1984).

Ocasionalmente essa espécie bacteriana se torna infecciosa para animais e plantas. Raramente a *P. aeruginosa* se torna causa de infecções em indivíduos saudáveis, entretanto, essa espécie assume importante papel como agente etiológico de infecções hospitalares. O processo infeccioso inicia-se com algum tipo de alteração ou destruição das barreiras físicas. Entre eles são evidenciadas a utilização de catéter urinário, da sonda oro-traqueal e a realização de cirurgias. Também podem aparecer nos pacientes com queimaduras que fazem uso de drogas imunossupressoras (POLLACK, 1984; LEE *et al*, 1999) e aqueles com *Diabetes*

mellitus, com hospitalização prolongada, e com uso prévio de outros antimicrobianos (CARMELI *et al*, 1999).

No Brasil, segundo dados do Programa SENTRY de Vigilância de Resistência a Antimicrobianos (PFALLER *et al*, 1998), a infecção por *P. aeruginosa* é a causa mais frequente de infecções em feridas cirúrgicas e o sexto patógeno mais comum em infecções da corrente sanguínea durante o período de 1997 a 2001 (SADER *et al*, 2004).

Frequentemente, isolados de *P. aeruginosa* apresentam um amplo espectro de resistência, podendo sobreviver a diferentes classes de agentes antimicrobianos, inclusive contra cefalosporinas de terceira e quarta gerações e carbapenêmicos (como imipenem e meropenem). Por estas razões, as infecções causadas por cepas de *P. aeruginosa* estabelecem um substancial desafio para a terapia antimicrobiana, trazendo ao cenário atual a inevitável necessidade de identificação de novos compostos bioativos capazes de inibir o crescimento e/ou destruir esses microrganismos (FUENTEFRÍA *et al*, 2008).

5.4 - ATIVIDADE LAXATIVA E MOTILIDADE INTESTINAL

Para se avaliar a atividade laxativa do extrato metanólico e partições de *S. macranthera*, as fezes dos animais foram examinadas 8 e 16 horas após o tratamento. Observou-se que a produção de fezes aumentou significativamente nos grupos tratados com extrato metanólico de sene comercial, extrato metanólico e partição em hexano de *S. macranthera* durante as primeiras 8 horas quando comparadas com o controle negativo salina (gráfico 1). Entretanto, não foi observado um aumento na produção de fezes para o grupo tratado com bisacodil. É importante ressaltar que os animais tratados com a partição em hexano apresentaram as fezes pouco mais pastosas, sem, todavia, determinar o aparecimento de fezes líquidas.

No entanto, quando as fezes foram analisadas após 16 h de tratamento, a produção de fezes aumentou significativamente em todos os grupos, provavelmente porque os animais passaram a ter livre acesso à comida após as primeiras 8 horas de tratamento (gráfico 2). Após esse período, nenhuma diferença significativa no número de fezes foi observada entre os diferentes grupos, o que indica que o tempo

de ação, tanto dos extratos de *S. macranthera*, quanto dos controles positivos, bisacodil e sene comercial, acontecem durante as primeiras 8 horas após sua administração.

Quanto ao efeito sobre a motilidade intestinal, somente o tratamento com partição em hexano de *S. macranthera* mostrou um aumento significativo no trajeto percorrido pelo carvão quando comparado com o controle negativo salina (gráfico 3).

Além disso, essa partição apresentou um aumento significativo na motilidade intestinal quando comparada com os controles positivos bisacodil e extrato metanólico de sene comercial, cuja função de estímulo da motilidade é claramente conhecida. Provavelmente isso se deve ao fato de que o bisacodil e o sene comercial só começam a exercer sua atividade entre 6 e 12 h após sua administração, de modo diferente da partição em hexano, que apresentou pronunciado aumento na motilidade intestinal nos primeiros 60 min após o tratamento.

A atropina é um alcalóide que interfere na ação da acetilcolina, estimulando o sistema nervoso parassimpático, que atua diminuindo peristaltismo intestinal. Para esse modelo experimental, a atropina foi utilizada como controle de constipação. Porém, nenhuma das amostras avaliadas apresentou atividade constipativa.

Como não foram observadas fezes diarreicas após o tratamento com partição em hexano, provavelmente ocorreu um aumento no peristaltismo intestinal, sem ocorrer um total relaxamento, confirmando seu potencial laxativo e antidiarreico (AKOMOLAFE *et al*, 2004).

A atividade laxativa e o aumento da motilidade intestinal causados por espécies do gênero *Senna* são atribuídos à presença de derivados fenólicos antracênicos e antraquinônicos (AGAKAR e JADGE, 1999 e SAMY e IGNACIMUTHU, 2000).

A atividade laxativa encontrada para o extrato metanólico e partição em hexano de *S. macranthera* se deve em parte à presença de emodina, identificada nessas amostras (desenho 14). Porém, com certeza, essa antraquinona não é a única responsável pelo efeito laxante, visto que, nas partições em acetato de etila, diclorometano e butanólica, também foram evidenciadas a presença de emodina e as mesmas não apresentaram tal atividade.

Portanto, pode-se sugerir que outras substâncias, de caráter mais apolar, possivelmente antronas, também sejam responsáveis pela atividade observada (tabela 2). As antronas, de maneira geral, são laxantes mais drásticos.

5.5 - ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

Para avaliação anti-inflamatória dos extratos de *S. macranthera*, utilizou-se, como agente inflamatório, a carragenina que é um agente inflamatório que produz inflamação por liberação de prostaglandinas (SANTOS e RAO, 1998; DI ROSA, GIROUD e WILLOUGHBY, 1971), ocasionando a formação de um edema rico em proteínas que contém grande número de neutrófilos (LO *et al*, 1982). O edema constitui um dos sinais mais característicos da inflamação aguda e é o acúmulo de líquido no tecido intersticial ou nas cavidades serosas causado pelo extravasamento do líquido intracelular para o espaço extracelular. A principal causa desse extravasamento é o aumento da pressão hidrostática e da permeabilidade celular. O edema inflamatório apresenta-se de forma localizada e é composto por água, eletrólitos e proteínas. A inflamação causada pela carragenina apresenta duas fases distintas envolvidas na resposta inflamatória aguda. A primeira fase (0-1 h) relaciona-se à liberação de histamina, serotonina e bradicinina, e a fase posterior (1-4 h) envolve a liberação de prostaglandinas, ativação das enzimas COX₁ e COX₂ e liberação de NO (SALVEMINI *et al*, 1996).

Foi avaliada a atividade anti-inflamatória do extrato metanólico e da partição em hexano de *S. macranthera*. Somente a partição em hexano apresentou propriedade anti-inflamatória e antiedematogênica inibindo significativamente o edema de pata (58 % $p < 0,05$) na dose de 400 mg/kg ao final das quatro horas de avaliação (gráfico 4). É importante ressaltar que, durante as duas primeiras horas, não ocorreu diferença significativa entre o diclofenaco de sódio (controle positivo) e partição em hexano de *S. macranthera*. A diferença entre eles apareceu somente após três horas da sua administração, o que significa que ambos estão atuando na primeira fase da inflamação. A partição em hexano apresentou atividade anti-inflamatória significativa na segunda fase da inflamação, mas não tanto quanto o diclofenaco de sódio.

Diclofenaco de sódio na dose de 10 mg/kg causou 75% de redução do edema de pata ao longo das 4 h (tabela 6). Este efeito de inibição sobre o edema foi avaliado em relação ao controle negativo (salina). O diclofenaco de sódio é um potente anti-inflamatório não-esteroidal, que inibe de maneira não-seletiva a ciclooxigenase, consequentemente inibindo a formação de prostaglandinas (KATSUNG, 2003). As prostaglandinas podem mediar a infiltração de proteínas plasmáticas induzidas por carragenina. É possível que, assim como o diclofenaco de sódio, componentes desta partição estejam inibindo a liberação de histamina e biossíntese de prostaglandinas.

Na prospecção fitoquímica da partição em hexano, esteroides e triterpenoides foram identificados (tabela 2). Como essas classes possuem diversas atividades farmacológicas, entre as quais anti-inflamatória, é possível que sejam responsáveis pela ação apresentada por essa partição.

Os terpenoides constituem uma grande variedade de substâncias de origem vegetal, sendo que esse termo é empregado para designar todas as substâncias cuja origem biossintética deriva de unidades do isopreno (AYDA KHADRI *et al*, 2008). Dados da literatura demonstram a atividade anti-inflamatória de compostos terpenoides, incluindo inibição de eicosanoides e da produção de citocinas, atividade da enzima hidrolítica, peroxidação lipídica (SAFAYHI e SAILER, 1997) e interação com a serina/tirosina quinase (HASMEDA *et al*, 1999).

Medeiros *et al* (2007) e Otuki *et al* (2005) demonstraram que α -amirina (triterpeno pentacíclico) apresenta uma ação anti-inflamatória com início bastante rápido em modelos animais de edema de orelha induzida pelo TPA (12-O-tratradecanoilforbol acetato), provavelmente por inibir a expressão da COX₂.

A literatura descreve alguns trabalhos que demonstram significativa atividade anti-inflamatória do composto lupeol (GEETHA e VARALAKSHMI, 2001), sitosterol e estigmasterol (GOMEZ *et al*, 1999; SENATORE *et al*, 1989). Um desses estudos foi realizado com as raízes de *Strobilanthus callosus* e *Strobilanthus ixiocephala*. O lupeol foi identificado como principal agente na supressão de PGE₂, sem qualquer efeito na liberação de leucotrienos, demonstrando que sua atividade anti-inflamatória possivelmente ocorre devido à sua capacidade de prevenir a produção de alguns mediadores pró-inflamatórios (FERNANDEZ *et al*, 2001).

6 - CONCLUSÃO

Substâncias apolares e derivados antracênicos extraídas de *S. macranthera* são os principais responsáveis pela sua atividade laxativa e pelo aumento da motilidade intestinal.

Esteroides e triterpenoides presentes na partição hexânica de *S. macranthera* parecem ser os responsáveis pela significativa atividade anti-inflamatória.

A partição em hexano possui significativa atividade contra *Pseudomonas* e apresenta alta seletividade contra esse micro-organismo.

S. macranthera possui outras substâncias fenólicas, além de flavonoides, com potencial atividade antioxidante.

Senna macranthera apresenta-se como uma fonte promissora de substâncias com grande potencial antibacteriano, laxativo, anti-inflamatório e antioxidante, o que estimula a continuidade do seu estudo.

REFERÊNCIAS:

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. 2003. **Imunologia celular e molecular** 4ª ed. Rio de Janeiro, Revinter, 422-444.

AFONSO-NETO, I.S., 2003. Atividade moluscicida e repelente de três espécies de *Euphorbia* (Euphorbiaceae) sobre *Leptinaria unilamellata* d'Orbygni (Gastropoda: Subulinidae). **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Juiz de Fora, 54.

AGARKAR, S. V.; JUDGE, D. R.; 1999. Phytochemical and pharmacological investigations of genus *Cassia*: A review. **Asian Journal Chemistry** **11**: 295-299.

AGOSTA, W.C.; 1997. Medicines and Drugs from Plants. **Journal of Chemistry Education**, **74**: 857-860.

AHMADIANI, A.; FEREDONI, M.; SEMNANIAN, S.; KAMALINEJAD, M.; SAREMI, S.; 1998. Antinociceptive and antiinflammatory effects of *Sambucus ebulus* rizome extract in rats. **Journal of Ethnopharmacology** **61**: 229-235.

AKIYAMA, T.; ISHIDA, J.; NAKAGAWA, S.; OGAWARA, H.; WATANABE, S.; ITOH, N.; SHIBUYA, M.; FUKAMI, Y.; 1987. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. **Journal of Biological Chemistry** **262**: 5592–5595.

AKOMOLAFE, R.O. 2004. An in vitro study of the effects of *Cassia podocarpa* fruit on the intestinal motility of rats. **Phytomedicine** **11 (2-3)**: 249-54.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. 2007. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz** **66 (1)**: 1-9.

ARAÚJO, C.A.C.; ALEGRIO, L.V.; LEON, L.L. 1998. Antileishmanial activity of compounds extracted and characterized from *Centrolobium sclerophyllum*. **Phytochemistry** **49**: 751-754.

AREZZO, A. 2000. Prospective randomized trial comparing bowel cleaning preparations for colonoscopy. **Surgical Laparoscopy Endoscopy & Percutaneous Techniques**; **10**: 215-217.

AYDA KHADRI, M.L.M.; SERRALHEIRO, J.M.F. NOGUEIRA, M.N.; SAMIRA SMITI, S.; ARAÚJO, M.E.M. 2008. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of

essential oils from *Cymbopogon schoenanthus* L. Spreng. Determination of chemical composition by GC–mass spectrometry and ^{13}C NMR. **Food Chemistry** **109** (3): 630-637.

BARATA, L.E.S.; SANTOS, L.S.; FERRI, P. H.; PHILLIPSON, J.D.; PAINE, A.; CROFT, S.L. 2000. Anti-leishmanicidal activity of neolignans from *Virola* species and synthetic analogues. **Phytochemistry** **55**: 589-595.

BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. 2001. **Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**. 1ª Ed. Art Med Editora Ltda: Porto Alegre, 123-125.

BARROSO, G.M.; MORIM, M.P.; PEIXOTO, A.L. & ICHASSO, C.L.F. 1999. Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas. Viçosa, **Imprensa Universitária**: 26-30.

BARROSO, G.M.; PEIXOTO, A.L.; COSTA, C.G.; ICHASSO, C.L.F.; GUIMARÃES, E.F.; LIMA, H.C. 1991. Sistemática das Angiospermas do Brasil. v.2. Viçosa, **Imprensa Universitária**: 12-15.

BENZIE, I.F.F. 1996. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. **International Journal Food Science Nutricion** **47**: 233-261.

BERGMANN, B.R.; COSTA, S.S.; MORAES, V.L.G. 1997. Brazilian medicinal plants: A rich source of immunomodulatory substances. **Brazilian Journal Association for the Advancement of Science** **49**: 395-402.

BERMAN, J .D.; BADARO,R.; THAKUR,C.P.; WASUNNA,K.M.; BEHBEHANI, K.; DAVIDSON,R.; KUSOL, F.; PANG,L.; WEERASURIYA,K. BRYCESON, A.D. 1998. Efficacy and safety of liposome amphotericin B for visceral leishmaniosis in endemic developing countries. **Bulletin of the World Health Organization** **76**(1): 28-32.

BEUBLER, E.; KOLLAR, G. 1988, Prostaglandin-mediated action of sennosides, **Pharmacology** **36** (Suppl. 1): 85-91.

BEUBLER, E.; SCHIRGI-DEGEN, A. 1993, Serotonin antagonists inhibit sennoside-induced fluid secretion and diarrhea. **Pharmacology** **47** (Suppl. 1): 64-69.

BIANCHINI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. 1999. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, **12(2)**: 123-130.

BOGDAN, C.; GESSENER, A.; SOLBACH, W.; ROLLINGHOFF, M. 1996. Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites. **Current Opinion of Immunology** **8**: 517-525.

BRANCO, A.; PINTO, A.C.; BRAZ-FILHO, R.; SILVA, E.F.; GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A. 2008. Rubrofusarina, um policetídeo natural inibidor da topoisomerase II- α humana. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** **18 (1)**: 703-708.

BRANDI, M.L. 1997. Natural and synthetic isoflavones in the prevention and treatment of chronic diseases. **Calcification Tissue International** **61(1)**: 5-8.

BRITO, S.A.R.M.; BRITO, S.A.A. 1993. Forty years of Brazilian medicinal plant research. **Journal of Ethnopharmacology** **39**: 53-67.

BRUSICK, D.; MENGES, U. 1997. Assessment of the genotoxic risk from laxative *senna* products. **Environmental and Molecular Mutagenesis** **29**: 1-9.

BURROWS, C.F., MERRITT, A.M. 1983. Influence of α -cellulose on my electric activity of proximal canine colon. **American Journal of Physiology** (**245**): 301-306.

CALIXTO, J. B. Medicamentos fitoterápicos. In: YUNES, R.; CALIXTO, J. B. 2001. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. 1ª Ed. Chapecó, SC. Argos Editora Universitária, UNOESCS, cap 7, 297-315.

CALIXTO, J.B. 2000. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicine (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** **33**: 179-189.

CAMACHO, M.R.; PHILLIPSON, J.D.; CROFT, L.S.; KIRBY, G.C.; WARHURST, D.C.; SOLIS, P.N. 2000. Terpenoids from *Guarea rhopalocarpa*. **Phytochemistry** **56**: 203-210.

CAO, J.H.; SOFIC, E.; PRIOR, R.L. 1997. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. **Free radical- biology & Medicine** **22**: 749-760.

CAPASSO, F.; MASCOLO, N.; AUTORE, G.; ROMANO, V. 1986. Laxatives and the production of autacoids by rat colon. **Journal of Pharmacy and Pharmacology (38)**: 627-629.

CARBALLO, J.L.; HERNANDEZ-INDA, Z.L.; PEREZ, P.; GARCIA-GRAVALOS, E.M.D. 2002. A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. **BMC Biotechnology. 2**: 1-5.

CARLINI, E.A. 1995. Pesquisa com plantas brasileiras usadas em medicina popular. "Medicamentos, drogas e saúde" (Hucitec/Sobravime, ed.), São Paulo, págs. 23-8.

CARMELLI, Y.; TROILLE N.; ELIOPOULOS, G.M.; SAMORE, M.H. 1999. Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* comparison of risks associated with different antipseudomonal agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy 43**: 1379-1382.

CARVALHO W.A.; LEMONICA, L. 2000. Mecanismos Celulares e Moleculares da Dor Inflamatória. Modulação Periférica e Avanços Terapêuticos, em: Braz, J.R.C., Castiglia, Y.M.M.- **Temas de Anestesiologia**. Curso de Graduação em Medicina, 2ª Ed, São Paulo, Artes Médicas, 265-280.

CHEVOLLEAU, S., MALLET, J.F., UCCIANI, E., GAMISANS, J., GRUBER, M., 1992. Antioxidant activity in leaves of some Mediterranean plants. **Journal of the American Oil Chemists Society, 69**: 1269-1271.

CHUNN, S.S.; VATEM, D.A.; LIN, Y.T.; SHETTY, K. 2005. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. **Process Biochemistry 40**: 809-816.

CONSTANZO, L.S. 2004. **Fisiologia**: Tradução Antonio Magalhães da Silva Moreira, Adilson Dias Salles, João Paulo de Campos. 2ª ed. Rio de Janeiro.: Elsevier, 404.

CORDELL, G.A. 1995. Changing strategies in natural products chemistry. **Phytochemistry 40**: 1585-1612.

CORREA, L.; NOVELLI, M.D. 2000. Patologia geral: inflamação. São Paulo, Faculdade de odontologia, USP. Acesso em www.fo.usp.br/lido/patoartergeral

CORRÊA, P.M. 1984. Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Brasil: 474 – 475.

COS, P.; CALOMME, M.; SINDAMBIWE, J. B.; DE BRUYNE, T.; CIMANGA, K.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J.; VANDEN BERGHE, D.B. 2001. Cytotoxicity and lipid peroxidation-inhibiting activity of flavonoids. **Planta Medica** **67**: 515–519.

COWAN, R.S. 1981. Caesalpinioideae. In: R.M. Polhill e P.H. Raven (eds.). **Advances in Legume Systematics part I**. Kew, Royal Botanic Gardens, 57-64 .

CUELLAR, M. J.; GINER, R. M.; RECIO, M. C.; MÁÑEZ S.; RÍOS J. L. 2001. Topical anti-inflammatory activity of some Asian medicinal plants used in dermatological disorders. **Fitoterapia** **72**: 221-229.

DAVID, J. P. L; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. 2004. Produtos Fitoterápicos: uma perspectiva de negócio para a indústria, um campo pouco explorado pelos farmacêuticos. **Infarma** **16**: 9-10.

DI ROSA M.; GIROUD J.P., WILLOUGHBY, D.A. 1971. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **Journal of Pathology** **104**: 15-28.

DUARTE-ALMEIDA M.C.T. 2006. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. Campinas. **Multiciência n 7**.

DUH, P.D.; YEN, G.C. 1997. Antioxidative activity of three water extracts. **Food Chemistry**, **60**: 639-645.

ELOFF, J.N. 1988. Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? **Journal of Ethnopharmacology** **60**: 1-8.

ELVIN-LEWIS, M. 2001. Should we be concerned about herbal remedies. **Journal of Ethnopharmacology** **75**: 141-164.

FERNANDEZ, M.A.; DE LAS HERAS, B.; GARCIA, M.D.; SAENZ, M.T.; VILLAR, A. 2001. New insights into the mechanism of action of the antiinflammatory triterpene lupeol. **Journal of Pharmacy and Pharmacology** **53**: 1533-1539.

FILE Jr., T. M. 2000. Visão Geral Sobre Resistência Bacteriana nos Anos 90. In: PLE CHEST. **The Cardiopulmonary and Critical Care Journal** (2): 3-9.

FLIG, E.; HERMANN, T.W.; ZABEL, M. 2000. Is bisacodyl absorbed at all from suppositories in man? **International Journal of Pharmacy** **196**: 11-20.

FLOWER, R.J.; MONCADA, S.; VANE, J.R. 1975. Analgesic, antipyretics and antiinflammatory agents, drugs employed in the treatment of gout. In: A.G. Gilman, L.S. Goodman (Eds.), **The Pharmacological Basis Of Therapeutics**. 7^a ed. T.W. Rail; F. Murad Assoc., MacMillan Publishing Co. Inc., New York, 674, 715.

FOURNET, A.; BARRIOS A.A.; MUNÓZ, V.; HOCQUEMILLER; CAVÉ A. 1992. Effects of natural naphthoquinones in BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis* and *L. venezuelensis*. **Annals of Tropical Medicine Parasitology** **43**: 219-222.

FUENTEFRIA, D.B.; FERREIRA, A.E.; GRÄF, T; CORÇÃO, G. 2008. *Pseudomonas aeruginosa*: disseminação de resistência antimicrobiana em efluente hospitalar e água superficial. **Revista da sociedade brasileira de medicina tropical** **41(5)**: 470-473.

GAGINELLA, T.S.; BASS, P. 1978. Laxatives: an update on mechanism of action. **Life Science** **23**: 1001-1009.

GALES, A.C.; JONES, R.N.; TURNIDGE, J.; RENNIL, R.; RAMPHAL, R. 2001. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates: occurrence rates, antimicrobial susceptibility patterns and molecular typing in the global SENTRY Antimicrobial Surveillance Program 1997-1999. **Journal Clinical Infectious Diseases** **32 (2)**: 146-155.

GARCIA, F.C.P.; DUTRA, V.F. 2004. Leguminosae nos campos rupestres. **CD-ROM Simpósios, palestras e mesas redondas do 55^o Congresso Nacional de Botânica**. Alpha Mídia Assessoria Fonográfica Ltda., Viçosa.

GARDNER, H.W. 1989. Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. **Free Radical Biology and Medicine** **7**: 65-86.

GEETHA, T.; VARALAKSHMI, P. 2001. Anti-inflammatory activity of lupeol and lupeol linoleate in rats. **Journal of Ethnopharmacology** **76(1)**: 77-80.

GOMEZ, M.A. ; SANTENZ, M.T.; M. D. GARCIA, M.D.; M. A. FERNANDEZ, M.A. 1999. A Study of the topical anti-inflammatory activity of *Achillea ageratum* on chronic and acute inflammation models. **Journal of Biosciences** **54 (11)**: 937-941.

GOVINDARAJAN, R., RASTOGI, S., VIJAYAKUMAR, M., SHIRWAIKAR, A., RAWAT, A.K.S., MEHROTRA, S., PUSHPANGADAN, P. 2003. Studies on the antioxidant activities of *Desmodium gangeticum*. **Biological & Pharmaceutic Bulletin** **26**: 1424-1427.

GRABLEY, S.; THIERICKE, R. 1999. Bioactive Agents from Natural Sources: Trends in Discovery and Application. In: **Advanced in biochemical engineering/biothechnology**. Ed. Springer Berlin / Heidelberg 64: 101-164.

GROS, E.G.; POMILIO, A.B.; SELDES, A.M.; BURTON, G. 1985. Introducción al estudio de los productos naturales. Washington, D.C.: Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Serie de química monografía n^o3.

GUTIERREZ-LUGO, M. T.; DESCHAMPS, J. D.; HOLMAN, T. R.; SUAREZ, E.; TIMMERMANN, B. N. 2004. Lipoxygenase Inhibition by Anadenanthoflavone, a New Flavonoid from the Aerial Parts of *Anadenanthera colubrina*. **Planta Medica** **(70)**: 263-265.

HABTERMARIAM, S. 1995. Cytotoxicity of diterpenes from *Prema schimperi* and *Prema oligotriha*. **Planta Medica** **61**: 368-69.

HALLIWELL, B., CROSS, C.E. 1994. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. **Environ Health Perspective** **102 (10)**: 5-12.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. 1999. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3 ed. New York: Oxford University: 1-936.

HAMMER, H.F.; SANTA ANA, C.A.; SCHILLER, L.R.; FORDTRAN, J.S. 1989. Studies of osmotic diarrhea induced in normal subjects by ingestion of polyethylene glycol and lactulose. **Journal Clinical Investiment** **83**: 66-73.

HASLAN, E. 1996. Natural polyphenols (vegetable tanins) as drugs: Possible modes of action. **Journal of natural Products** **59**: 205.

HASMEDA, M.; KWEIFIO.O. G.; MACRIDES, T.; POLYA, G. M. 1999. Selective inhibition of eukaryote protein kinases by anti-inflammatory triterpenoids. **Planta Médica** **64**: 14-18.

HATTORI, M.; KANDA T.; SHU, Y.Z.; AKAO, T.; KOBASHI, K.; NAMBA, T. 1988. Metabolism of barbaloin by intestinal bacteria. **Chemistry and Pharmacology Bulletin** **36**: 4462-4466.

HEIDEMANN, A.; MILTENBURGER, H.G.; MENGES, U. 1993. The genotoxicity status of senna. **Pharmacology** **47**: 178–186.

IRWIN, H.S.; BARNEBY, R.C. 1982. The American Cassiinae –A synoptical revision of Leguminosae - Tribe Cassieae subtribe Cassiinae in the New World. **Memoirs of The New York Botanical Garden** **35**: 1-918.

JAFRI, M. A., SUBHANI, M. J.; JAVED, K.; SINGH, S. 1999. Hepatoprotective activity of leaves of *Cassia occidentalis* against paracetamol and ethyl alcohol intoxication in rats. **Journal of Ethnopharmacology** **66**: 355-361.

JANSSEN-OLESEN; OTTOSSON, A.; CANTERA, L.; STRUNK, S.; LASSEN, L. H.; OLESSEN J.; MORTENSEN, A.; ERNGEL, U.; EDVINSON, L. 1997. Role of endothelium and nitric oxide in histamine-induced response in human arteries and detection of mRNA encoding H1 and H2 receptors by RT-PCR. **British Journal of Pharmacology** **121**: 41-48.

JAYAPRAKASHA, G.K.; PATIL, B.S. 2006. In vitro evaluation of the antioxidant activities in the fruit extracts from citron and blood orange. **Food chemistry** **101**: 410-418.

KAM, P.C.A.; LEE, A.U.L. 2000. Cyclo-oxygenase isoenzymes: physiological and pharmacological role. **Anesthesia** **55**: 442-449.

KAM, T.S., SIM, K.M., KOYANA, T., TOYOSHIMA, M., HAYASHI, M.; KOMIYAMA, K. 1997. Cytotoxic and Leishmanicidal aminoglycosides and aminosteroids from *Holarrhena curtisii*. **Journal of Natural Products** **61**: 1332-1336.

KATSUNG, B.G. 2003. In: David, F.; Altman, M.D.. Fármacos utilizados nas doenças gastrointestinais. **Farmacologia básica & clinica**. 8ª ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 925.

KATSUNG, B.G. 2003. In: Furst, D.E.; Munster, T.. Antiinflamatórios não-esteroidais, agentes anti-reumáticos, modificadores da doença, analgésicos não-opioides e drogas utilizadas na gota. **Farmacologia básica & clinica**. 8ª ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 518.

KAYSER, O.; KIDERLEN, A. F.; LAATSCH, H.; CROFT, S.L. 2000. *In vitro* leishmanicidal activity of monomeric and dimeric naphthoquinones. **Acta Tropical** **77**: 307-314.

KIM, Y.; SONG, Y.S.; KIM, S.K.; KIM B.C.; LIM C.J.; PARK, E.H. 2004. Anti-inflammatory and related pharmacological activities of the n-BuOH sugfraction of mushroom *Phellinus linteus*. **Journal of Ethnopharmacology** **93**: 141-146.

KUPELI, E. RHAN, I.; TOKER, G.; YESILADA, E. 2006. Anti-inflammatory and antinociceptive potential of *Maclura pomifera* (Rafin.) Schneider fruit extracts and its major isoflavonoids scandenone and auriculasin. **Journal of Ethnopharmacology** **(107)**: 169-174.

LAISON, R.; SHAW, J.J. 1978. Epidemiology and ecology of leishmaniosis in Latino America. **Nature** **273**: 595-600.

LAN, M.; WANG, X.; WU, H.P.; FAN, D.M. 2001. Biological effects of senna extract on human intestinal epithelial cells. **Shijie Huaren Xiaohua Zazhi** **(9)**: 555-559.

LEDERLE, F.A.; BUSCH D.L.; MATTOX, K.M.; WEST, M.J.; ASKE; D.M. 1990. Costeffective treatment of constipation in the elderly: a randomized double-blind comparison of sorbitol and lactulose. **American Journal Medicine** **89**: 597-601.

LEE, S.C.; FUNG, C.P.; LIU P.Y.; WANG, T.C.; SEE, L.C., LEE, N.; CHEN, S.C., SHIECH, W.B. 1999. Nosocomial infections with ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk, factors and outcome. **Infection Control and Hospital Epidemiology** **20**: 205-207.

LEMLI, J. 1988. Metabolism of Sennosides An Overview **Pharmacology** **36 (1)**: 126-128.

LEWIS, G. P.; LIMA, M. P., 2005. Pseudopiptadenia Rauschert no Brasil. **Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro** **30**: 43-67.

LHULLIER, C.; HORTA, P.A.; FALKENBERG, M. 2006. Avaliação de extratos de macroalgas bênticas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **16**: 158-163.

LIMA, H. C. 2004. Leguminosas arbóreas da floresta atlântica: riqueza e endemismo no estado do Rio de Janeiro. In: 55º Congresso Nacional de Botânica, 2004, Viçosa, MG. **Simpósios, Palestras e Mesas Redondas**. Viçosa, MG : Sociedade Botânica do Brasil/Universidade Federal de Viçosa, 1-12 .

LIMA, H. C. D.E; CORREIA, C.M.B.; FARIAS, D. S., 1994. Leguminosae. In: M.P.M. de Lima; R.R. Guedes-Bruni (eds). Reserva Ecológica de Macaé de Cima: Nova Friburgo-RJ: **Aspectos Florísticos das Espécies Vasculares**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 167-228 .

LIMA, H. C., 2000. Leguminosas arbóreas da Mata Atlântica. Uma análise da riqueza, padrões de distribuição geográfica e similaridades florísticas em remanescentes florestais do estado do Riode Janeiro. **Tese de doutorado**. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

LO, T.N., ALMEIDA, A.P.; BEAVEN, M.A. 1982. Dextran and carrageenan evoke different inflammatory response in rat with respect to composition of infirates and effect of indomethacin. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** **221**: 261-267.

LOCKE, G.R.; PEMBERTON, J.H.; PHILLIPS, S.F. 2000. American Gastroenterological Association medical position statement: Guidelines on constipation. AGA technical review on constipation. **Gastroenterology** **119**: 1761-1778.

LOGUERCIO, A.P.; BATTISTIN, A.; VARGAS, A.C.; HENZEL, A.; WITT, N.M. 2005. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* L. Skells). **Ciência Rural** **35 (2)**: 371-376

LORENZI, H. 1992. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Ed. Plantarum Ltda.:165 e 352 .

M'BONGO, N.; LOISEAU, P.M.; LAWRENCE, F.; BORIES, C.; CRACIUNESCU, D.G.; ROBERT- GERO, M. 1997. In vitro sensitivity of *Leishmania donovani* to organometallic derivatives of pentamidine. **Parasitology Research** **83**: 515-517.

MAHIO U, v., ROBLLOT, F., HOCQUEMILLER, R., CAVÉ, A. 1995. Piperogalin, a new prenylated diphenol from *Peperomia galioides*. **Journal of Natural Products** **58**: 324-328.

Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde 2007 – 2ª ed. atualizada – Brasília : Editora do Ministério da Saúde.

MARTINEZ-FLORES, S. 2002. Propiedades antiinflamatorias de los flavonoides de la dieta. **Nutricion Hospitalare** **17(6)**: 271-278.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. 2000. Buscando a saúde por meio das plantas medicinais. **Plantas medicinais** (UFV, ed.), Viçosa: 17-55.

MATOS, F. J. A., 1997. Em *Introdução à Fitoquímica Experimental*; Edições UFC: Fortaleza, 39 .

McLAUGHLIN, J.L.; SAIZARBITORI, T-C.; ANDERSON, J.E. 1995. Tres bioensaios simples para quimicos de productos naturales. **Revista de la Sociedad Venezolana Quimica** **18**: 13-18.

MEDEIROS, R.; OTUKI, M. F.; AVELLAR, M. C.; CALIXTO, J. B. 2007. Mechanism underlying the inhibitory action of the pentacyclic triterpene α -amyrin in the mouse skin inflammation induced by phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13 acetate **European Journal of Pharmacology** **559 (2-3)**: 227-235.

MENGS, U., MITCHELL, J., MCPHERSON, S., GREGSON, R., TIGNER, J. 2004. A 13-week oral toxicity study of senna in the rat with an 8-week recovery period. **Archives of Toxicology** **78**: 269–275.

MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E.S. 1989. Plantas medicinais: a coerência ea confiabilidade das indicações terapêuticas. **Caderno de Farmácia** **5 (1/2)**: 93-119.

MERKEN, H. M.; BEECHER, G. R. 2000. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. **Journal Agricultural Food Chemistry**, **48**: 577–599

MEYER, B.N.; FERRIGNI, N.R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, D.E.; MACLAUGHLIN, J.L. 1982. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, **45**: 31-34

MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P.R.; VAN-BEEK, T.A. 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and plant extracts. **Food Chemistry**, **85**: 231-237.

MITCHELL, J.M., MENGES, U., MCPHERSON, S., ZIJLSTRA, J., DETTMAR, P., GREGSON, R., TIGNER, J.C. 2006. An oral carcinogenicity and toxicity study of senna (Tinnevely senna fruits) in the rat. **Archives of Toxicology** **80**: 34–44.

MITTAL, N., GUPTA, N., SAKSENA S., GOYAL, N., ROY, U., RASTOGI, A. K. 1998. Protective effect of picrolive from *Pichrorhiza kurroa* against *Leishmania donovani* infections in *Mesocricetus auratus*. **Life Sciences** (**63**): 1823-1834.

MORENO, J.J. 1997. Antiinflammins: endogenous nonapeptides with regulatory effect on inflammation. **General Pharmacology** **28**: 23-26.

MORIYAMA, H.; IIZUKA, T.; NAGAI, M.; MIYATAKA, H.; SATOH, T. 2003. Antiinflammatory activity of heat-treated *Cassia alata* leaf extract and its flavonoid glycoside. **YAKUGAKU ZASSHI** **123(7)**: 607–611

MOSMANN, A. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity. **Journal of Immunology Methods** **65**: 55-63.

MOTA, K.S.L.; PITA, J.C.L.R.; ESTEVAM, E.C.; MEDEIROS, V.M.; TAVARES, J.F.; AGRA, M.F.; DINIZ, M.F.F.M.; SILVA, M.S.; BATISTA, L.M. 2008. Evaluation of the toxicity and antiulcerogenic activity of the ethanol extract of *Maytenus obtusifolia* Mart. Leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **18**: 441-446.

MULLER, R.L.; LNSEL, P.A.; MELNON, L.K. 1978. Inflammatory disorders. In: L.K. Menon; H.F. Morelli (Eds.), **Clinical Pharmacology**, 2^a ed., MacMillan Publishing Co. Inc., New York, 674, 715.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A** **1054 (1-2)**: 95-111.

NARAYANA, K.R.; REDDY, M.S.; CHALUADI, M.R.; KRISHNA, D.R. 2001. Biflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. **Indian Journal of Pharmacology (22)**: 2-16

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS), 2002. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Approved standard M27-A2 – P. National Committee For Clinical Laboratory Standards. Wayne, PA.

NEVES, D. P.; MELLO, A.L.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. 1999. **Parasitologia Humana**, 9ª ed, Atheneu, São Paulo, 61-65.

NICK, A.; RALI, T.; STICHER, O. 1995. Biological screening of traditional medicinal plants from Papua New Guinea. **Journal of Ethnopharmacology 49**: 147-156.

NISS, A.M.; DICKHUNTH, H.H.; NORTHOFF, H.; FEHRENBACH, E. 1999. Free radicals and oxidative stress in exercise-immunological aspects. **Exercise Immunology Review 5**: 22-56.

OLIVEIRA, A.B e BRAGA, F. C. 2003. Produtos naturais bioativos de plantas brasileiras e sua contribuição para o desenvolvimento da química medicinal. **Arquivos Brasileiros de Fitomedicina científica 1**: 49-58.

OLIVEIRA, R. B.; ALVES, R. J. 2002. Agentes antineoplásicos biorredutíveis: uma nova alternativa para o tratamento de tumores. **Química Nova, 25(6)**: 976-984.

ORHAN,D.D.; KUPELI,E.; YESILADA, E.; ERGUN, F. 2006. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of flavonoids isolated from *Viscum album* ssp. *album*. **Zeitschrift fur Naturforschung (61)**: 26-30.

OTUKI, M.F.; LIMA, F.V.; MALHEIROS, A.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. 2005. Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and α -amirin pentacyclic triterpene. **European Journal of Pharmacology 507**: 253-259.

OYAKU, M. 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. **Japanese Journal of Nutrition, 44**: 307-315.

PALAMICHAMY, S.; NAGARAGAN, S. 1990. Antifungal activity of *Cassia alata* leaf extract. **Journal of Ethnopharmacology 29**: 337.

PFALLER, M.A.; JONES, R.N.; DOERN, G.V.; KUGLER, K. 1998. Bacterial pathogens isolated from patients with bloodstream infection: frequencies of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns from the SENTRY antimicrobial surveillance program (United States and Canada, 1997). **Antimicrob Agents Chemotherapy** **42**: 1762-1770.

PIETTA, P.; SIMONETTI, P.; GARDANA, C.; MAURI, P. 2000. Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) of Ginkgo biloba flavonol and Camellia sinensis catechin metabolites. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** **23(1)**: 223-226.

PINTO, A.G. 2002. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova** **25(1)**: 45-61.

PINTO, C.N., DANTAS, A.P.; DE MOURA, K.C.; EMERY, F.S.; POLEQUEVITCH, P.F.; PINTO, M.C. 2000. Chemical reactivity studies with naphthoquinones from *Tabebuia* with anti trypanosomal efficacy. **Arzneim- Forsch/ Drug Research** **50**: 1120-1128.

PIRES, L.; GORIN, P.A.J.; REICHER, F.; SIERAKOWSKI, M.R. 2001. An active heparinoid by sulphation of galactomannan extracted from endosperm of *Senna macranthera* seeds. **Carbohydrate polymers** **46**: 165-169.

POLLACK, M. 1984. The virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. **Revista de Infectologia. Dis.** **6 (3)**: 617-626.

PORTILLO, A., VILA R, FREIXA B, ADZET T, CAÑIGUERAL S. 2001 Antifungal activity of Paraguayan plants used in traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology** **76**: 93-98.

RAMALHO, V.C.; JORGE, N. 2006. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova** **29 (4)**: 755-760.

RASKIN, I.; RIBNICKY, D.M.; KOMARNYTSKY, M.; NEBOJSA ILIC, N.; POULEV, A.; BORISJUK, N.; BRINKER, A.; MORENO, D.A.; RIPOLL, C.; YAKOBY, N.; O'NEA J.M.; CORNWELL, T.; PASTOR, I.; FRIDLENDER, B. 2002. Plants and human health in the twenty-first century. **Trends in Biotechnology** **20(12)**: 522-531.

RATES, R.M.K.; 2001. Plants as source of drug. **Toxicon** **39**: 603-613.

RAVELO, A.G.; ESTEVEZ-BRAUM, A.; CHAVES-ORELLANA, H.; PEREZ-SACAU, E.; MESA-SIVERIO, D. 2004. Recent studies on natural products as anticancer agents. **Current Topics in Medicinal Chemistry 4**: 214-265.

REYNAUD, J.; GUILLET, D.; TERREUX, R.; LUSSIGNOL, M.; WALCHSHOFER, N. 2005. Isoflavonoids in non-leguminous families: an update. **Natural Products Reports 22**: 504–515.

RÍOS, J.L.; RECIO, M.C. 2005. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal Ethnopharmacology 100**: 80-84

RUIZ, A.L.T.G.; MAGALHÃES, E.G.; MAGALHÃES, A.F.; FARIA, A.D.; AMARAL, M.C.E.; SERRANO D.R.; ZANOTTI-MAGALHÃES, E.M.; MAGALHÃES, L.A. 2005. Avaliação da atividade tóxica em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata* de extratos de quatro espécies do gênero *Eleocharis* (Cyperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia 15**: 98-100.

SADER, H.S.; GALES, A.C.; PFALLER, A.M.; MENDES, R.E.; ZOCCOLI, C.; BARTH, A.; JONES, R.N. 2004. SENTERY antimicrobial surveillance program report: Latin American and Brazilian results for 1997 through 2001. **Brazilian Journal Disorders 8**: 25-79.

SAFAIHY, H.; SAILER, E.R. 1997. Anti-inflammatory actions of pentacyclic terpenes. **Planta Medica (63)**: 487-193.

SALVEMINI, D.; WANG, Z-Q; WYATT, P.S.; BOURDON, D.M.; MARINA, M.H.; MANNING, P.T.; CURRIE, M.G. 1996. Evidence of peroxynitrite involvement in the carrageenan-induced rat paw edema. **European Journal of Pharmacology 15; 303 (3)**: 217-220.

SAMY, R.P.; IGNACIMUTHU, S. 2000. Antibacterial activity of some folklore medicinal plants used by tribals in Western Ghats of India. **Journal of Ethnopharmacology 69**: 63-71.

SANTOS, F.A.; RAO, V.S. 1998. Inflammatory edema induced by 1,8-cineole in the hindpaw of rats: a model for screening antiallergic and anti-inflammatory compounds. **Phytomedicine 5**: 115-119.

SANTOS, R.N.; SILVA, M.G. V. 2008. Constituintes químicos do caule de *Senna reticulata* Willd. (Leguminosae). **Química Nova** **35 (8)**: 1979-1981.

SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG, N. C.; EISENSTEIN, B. I.; MEDOFF, G. 2002. **Microbiologia**. 3ª ed. Guanabara Koogan 120: 127- 642.

SCHENEL, E.P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M.L.; 2000. In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Melo, J.C.P.; Mentz, L.A. Petrovick, P.R. (Eds.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Ed da Universidade UFRGS, Porto Alegre, Florianópolis: 610-618.

SCHILLER, L. R. 2001. Review article: the therapy of constipation. **Alimentary and Pharmacology Therapeutic** **15**: 749-763.

SCHILLER, L.R. 1997. Cathartics, laxatives, and lavage solutions. In: Friedman G, Jacobson, E.D.; McCallum R.W.; eds. **Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 159-174.

SCHMIDT, P.C.; ORTEGA, G.G. 1993. Passionsblumenkraut: Bestimmung des gesamtflavonoidgehaltes von passiflore herba. **Deutsche Apotheker Zeitung, Alemanha**, 133 (47): 4457-4466.

SCHULZ, V.; HANSEL, R.; TYLER, V.E. 2002. Plantas medicinais, fitomedicamentos e fitoterapia. Fitoterapia racional - um guia de fitoterapia para as ciências da saúde (Mande, ed.), Barueri: 1-40.

SENATORE, F. 1989. Steroidal constituents and anti-inflammatory activity of the horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) bark. **Bollettino - Societa Italiana di Biologia Sperimentale** **65 (2)**: 137-41.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. 1995. Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications. **Food Chemistry**: 235-273.

SHOEB, M.; MACMANUS, S.; M.; JASPARS, M.; KONG-THOO-LIN, P.; NAHAR, L.; CELIK, S.; SARKER, S.D. 2007. Bioactivity of two Turkish endemic *Centaurea* species, and their major constituents. **Revista Brasileira de Farmacognosia** **17**: 155-159.

SILVA, T.M.S.; NASCIMENTO, R.J.B.; BATISTA, M.M.; AGRA, M.F.; CÂMARA, C.A. 2007. Brine shrimp bioassay of some species of *Solanum* from Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia** **17**: 35-38.

SIMÕES, C.O.M.; MENTZ, L.A.; SCHENKELL, E.P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J.C.P.E.; PETROVICK P.L. 2007. **Farmacognosia da planta ao medicamento. Porto Alegre.** Editora da Universidade/UFRGS, 421 e 662.

SOARES, S. E. 2002. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista brasileira de Nutrição (15):** 71-81.

SORG, O. 2004. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? **C.R. Biology. 327:** 649-662.

SOSLOW, R.A.; DANNENBERG,A.J.; RUSH D.; WOERNER B.M.; KHAN, K.N.; MASFERRER, J.; KOKI, A.T. 2000. Cox-2 is expressed in human pulmonary, colonic and mammary tumors. **Cancer 89 (12):** 2637-2645.

SUNDAR, S.; AGRAWAL, G.; RAI, M.; MAKHARIA, M. K.; MURRAY, H. W. 2001. Treatment of Indian visceral leishmaniasis with single or daily infusions of low dose liposoma amphotericin B: randomized trial. **BMJ (323):** 419-422. Acesso em www.bmj.com/cgi/content/full/323/7310/419

SUNIL, K. K. C.; MULLER, K. 1998. Inhibition of leukotriene biosynthesis and lipid peroxidation in biological models by the extract of *Cassia fistula*. **Phytoterapy research (12):** 526-528.

TIWARI, R. D.; MISRA, G. R. 1985. **Planta Medica (28):** 182.

TONA, L.; NGIMBI, N. P.; TSAKALA, M.; MESIA, K.; CIMANGA, K.; APERS, S.; BRUYNE, T. D.; PIETERS, L.; TOTTE, J.; VLIETINCK, A. J. 1999. **Journal Ethnopharmacology 68(1-3):** 193-203.

TORTORA, G.J.; GRABOWSKI, S.R. 2000. **Princípios de anatomia e fisiologia. 9ª ed.,** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A..

TRABER, M.G. 1997. Cellular and molecular mechanisms of oxidants and antioxidants. **Mineral and Electrolyte Metabolism Basel 23 (3/6):** 135-139.

VACA, C.E.; WILHEM, J.; HARMS-RINGDAHL, M. 1988. Interaction of lipid peroxidation products with DNA a review. **Mutation Research** **195**: 137-149.

VALVERDE, A.; HAY, J.M.; FINGERHUT, A.; BOUDET, M.J.; PETRONI, R.; POULIQUEN, X.; MSIKA, S.; FLAMANT, Y. 1999. Senna vs polyethylene glycol for mechanical preparation the evening before elective colonic or rectal resection: a multicenter controlled trial. **Archives Surgery** **134**: 514-519.

VAN GORKOM, B. A. P.; VRIES, E. G. E.; KARRENBELD A.; KLEIBEUKER, J. H. 1999. Review article: anthranoid laxatives and their potential carcinogenic effects. **Aliment and Pharmacology Therapeutic** **13**: 443-452.

VAN, F.H.L. 1976. Some aspects of the pharmacology of anthraquinone drugs. **Pharmacology** **14 (Suppl. 1)**: 18-29.

VEITCH, N.C. 2009. Isoflavonoids of the leguminosae. **Natural Products Reports** **26 (6)**: 776-802

VERPOORTE, R. 1999. Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. **Drug Discovery Today** **3**: 232-238.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V.S.; FURLAN, M.; BARREIRO, E.J.; YOUNG, M.C.M.; TOMAZELA, D.; EBERLIN, M.N. 2004. Further piperidine alkaloids from flowers and green fruits of *Cassia spectabilis*. **Jornaul Natural Products** **67**: 908-910.

VIEGAS JR, C.; REZENDE, A.; SILVA, D.H.S.; CASTRO-GAMBÔA, I., BOLZANI V.S.2006. Aspectos químicos, biológicos e etnofarmacológicos do gênero *Cassia*. **Química Nova** **29(6)**: 1279-1286.

VIEGAS JR, C.; SILVA, D.H.S.; PIVATTO, M.; REZENDE, A.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V.S.; MURALEEDHARAN, N. G. 2007. Lipoperoxidation and cyclooxygenase enzyme inhibitory piperidine alkaloids from *Cassia spectabilis* green fruits. **Journal Natural Products** **70**: 2026-2028.

WANG, S. Y.; YANG, K. W.; HSU, Y. T.; CHANG, C. L.; YANG, Y. C. 2001. The differential inhibitory effects of genistein on the growth of cervical cancer cells in vitro. **Neoplasma** **48**: 227-233.

WILCKENS, T. 1995. Glucocorticoids and immune function: physiological relevance and pathogenic potential of hormonal dysfunction. **Trends in Pharmacology Science** **16**: 193-197.

WILLCOX, M. L.; COSENTINO, M. J.; PINK, K.; BODEKER, G.; WAYLING, S. 2001. Natural products of the treatment of tropical diseases. **Trends in Parasitology** **17(2)**: 58-60.

WINTER, C.A.; RISLEY, E.A.; NUSS, G.W. 1962. Carrageenin-induced edemas in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Society for Experimental Biology and Medicine** **111**: 544-547.

WOISKY, R.G. 1996. Métodos de controle químico de amostras de própolis, para a obtenção do grau em Fármacos de Medicamentos. Tese de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, 74.

WONG, C. L.; WAY, M. K. 1981. Effects of aspirin and paracetamol on naloxone reversal or morphine-induced inhibition of gastrointestinal propulsion in mice. **European Journal Pharmacology** **73(1)**: 11-19.

YAGI, T. E.; MIYAWAKI Y, NISHIKAWA A, YAMAUCHI K, KUWANO S. 1991. Suppression of the purgative action of rheinanthrone the active metabolite of sennosides A and B by indomethacin in rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. **43**: 307-310.

YANG, D. M.; LIEW, F.Y. 1992. Effects of qinghaosu (artemisin) and its derivatives on experimental cutaneous leishmaniasis. **Parasitology** **106**: 7-11.

Site: acesso em: www.akvaristi.org/img_znanja/znanja_fil.html).

ANEXO

Anexo A: Cromatogramas obtidos por CLAE do extrato metanólico de sene, extrato metanólico e partições de *S. macranthera*.

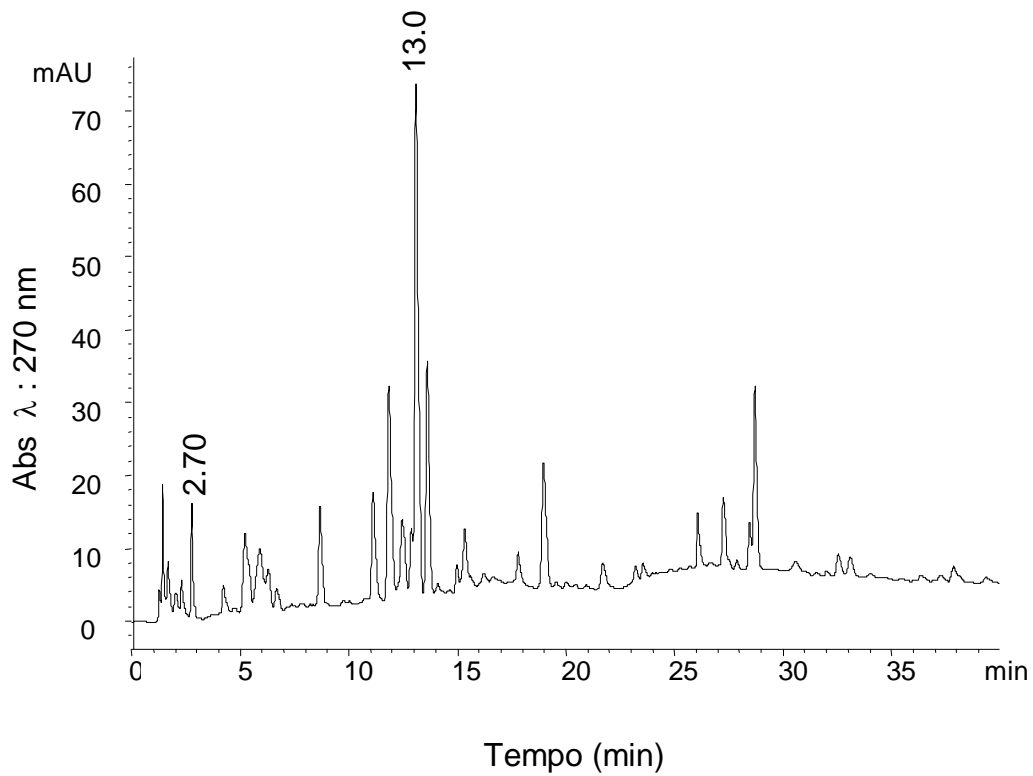


Figura 1: Extrato metanólico de sene comercial.

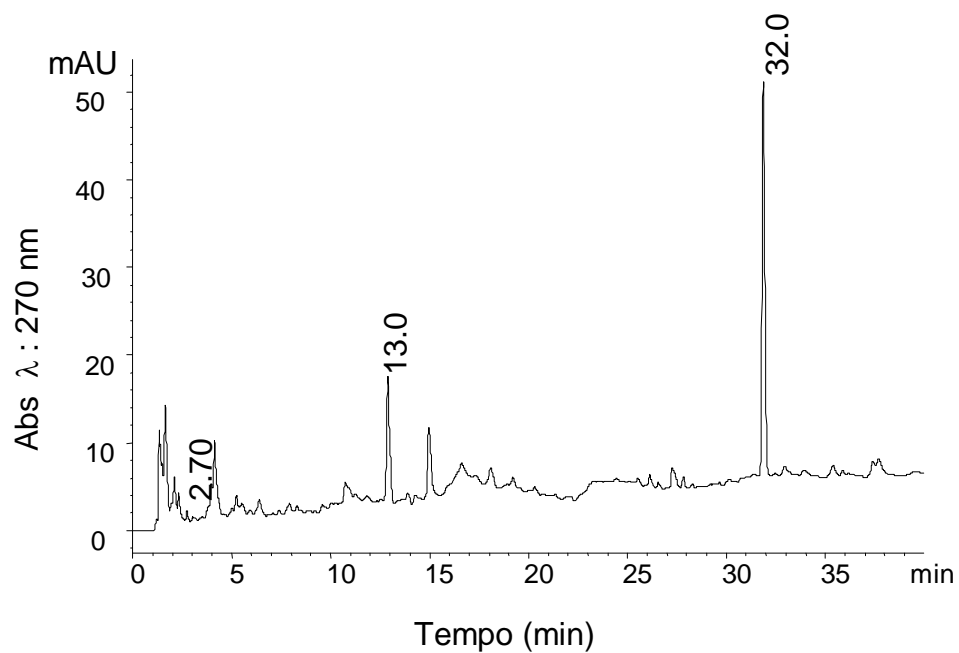


Figura 2: Extrato metanólico de *S. macranthera*.

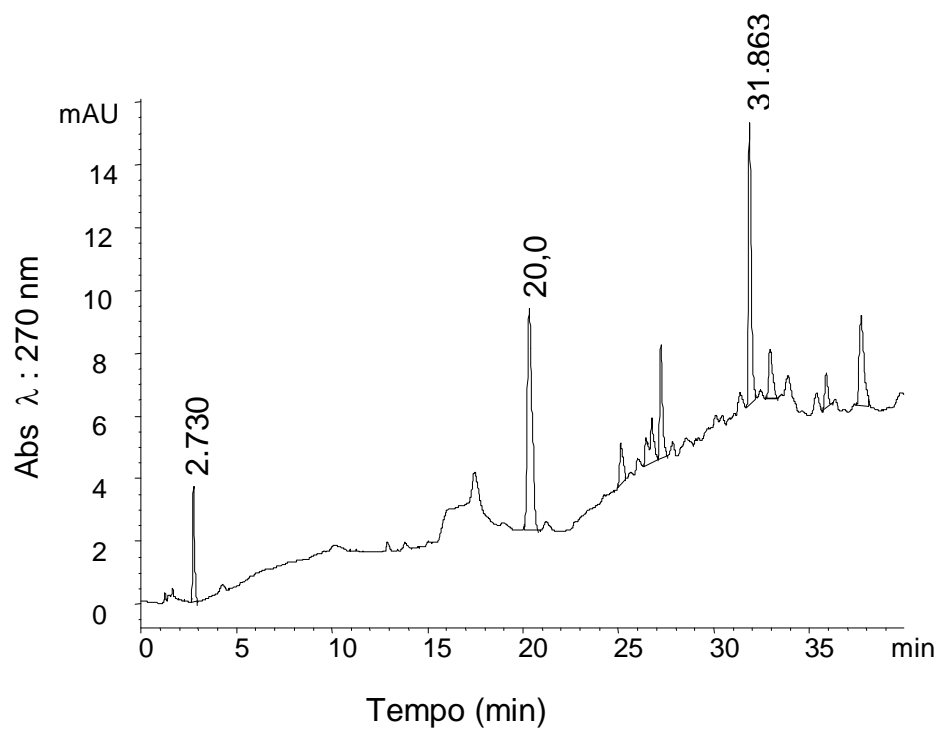


Figura 3: Partição em hexano de *S. macranthera*

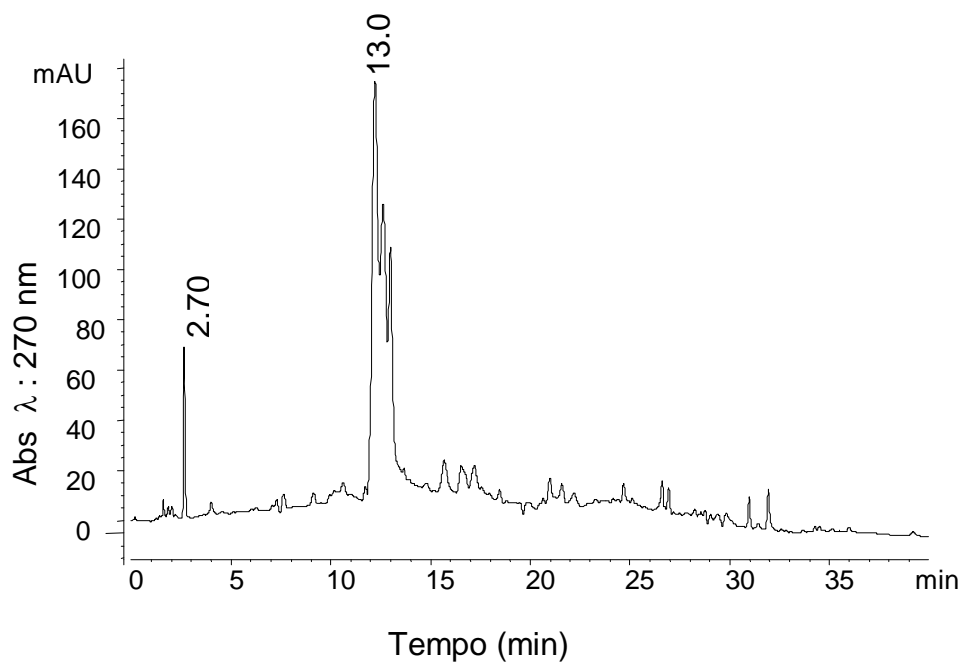


Figura 4: Partição em diclorometano de *S. macranthera*.

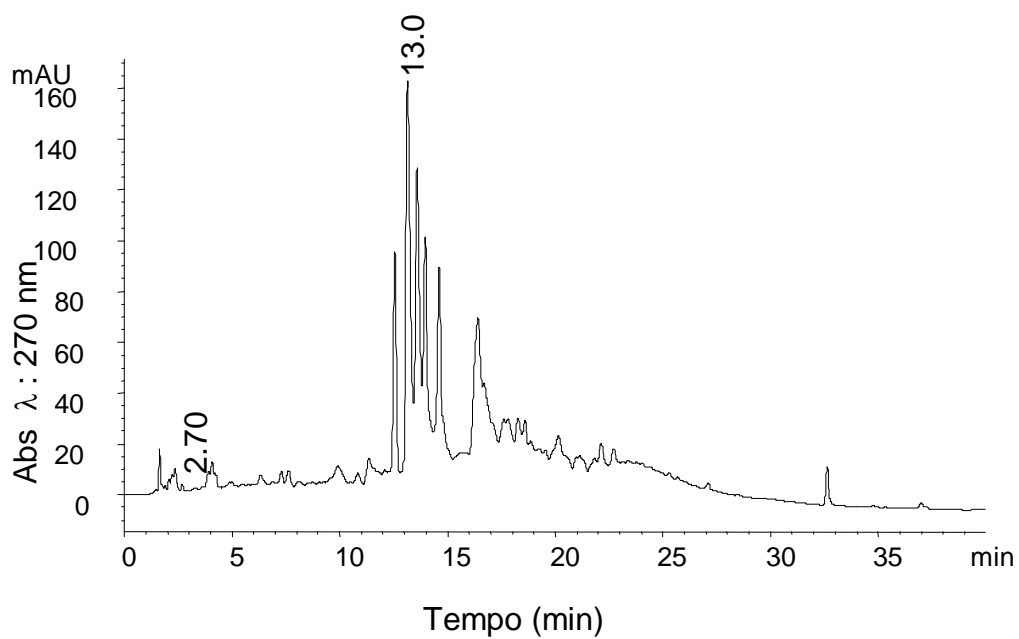


Figura 5: Partição em acetato de etila de *S. macranthera*.

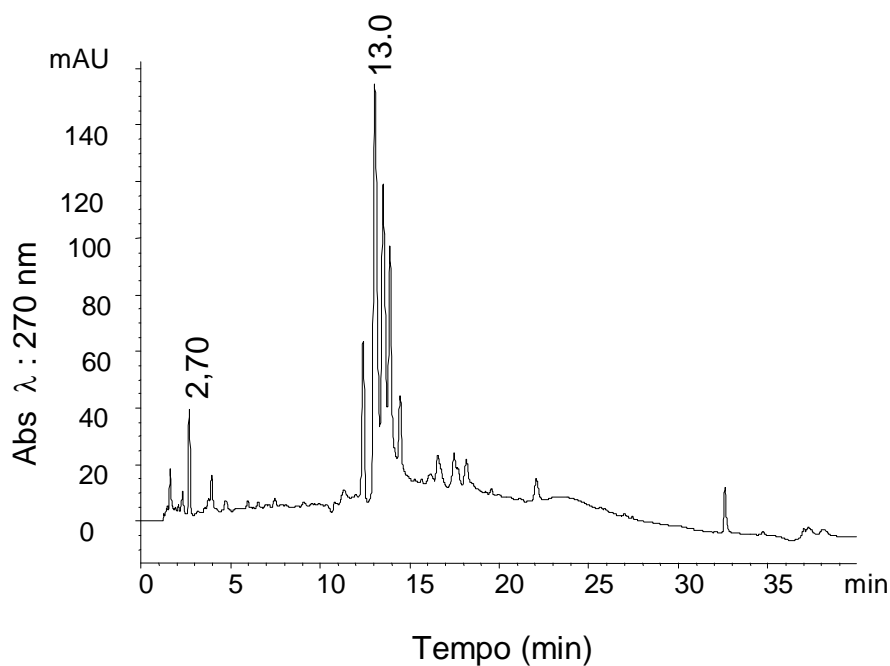


Figura 6: Partição em butanol de *S. macranthera*.

Anexo B: Artigo submetido revista científica, intitulado Anti-inflammatory, laxative and intestinal motility effects of *Senna macranthera* leaves.

Anti-inflammatory, laxative and intestinal motility effects of Senna macranthera leaves

Lyvia Guarize, Juliana C. da Costa, Leandro B. Dutra, Renata F. Mendes, Isabel V.A. Lima, Elita Scio*

Departamento de Bioquímica – ICB – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, 36036 900, Brazil

* Corresponding author.

Tel.: +55 32 2102 3208; fax: +55 32 2102 3216

E-mail address: elita.scio@uff.edu.br

Abstract

Several species of *Senna* are well known for their therapeutic properties, being used in folk medicine to treat throat inflammation and constipation. In this regard, the anti-inflammatory, laxative and intestinal motility effects of different extracts of *Senna macranthera* (Collad.) H. Irwin & Barneby. leaves were determined. The hexane extract significantly reduced carrageenan-induced paw edema in rats in a manner similar to that of sodium diclofenac. Laxative effect was observed for the methanolic and hexane extracts comparative to the standard drug bisacodyl, however only the hexane extract increased the intestinal motility in the studied period. Moreover, the extracts were evaluated for their antioxidant activity and the ethyl acetate extract presented a pronounced activity comparable to the standard rutin. Phytochemical screening was also performed and phenolic compounds like flavonoids, tannins and coumarins were observed in all extracts except for the hexane one which presented anthrones, triterpenes and steroids in its composition. The HPLC profile showed the presence of the anthraquinone emodine in all extracts.

Key words: *Senna macranthera*; laxative; intestinal motility; anti-inflammatory; antioxidant

1. Introduction

Senna is a large genus in the family Fabaceae of around 250 species of flowering plants. This diverse genus is native throughout the tropics, with a small number of species reaching into temperate regions. Almost all species were at one time or another placed in *Cassia* (Agarkar and Jadge, 1999). Typically, *Senna*

species are recognized as ornamental due to the beauty of their yellowish flowers (Viegas *et al*, 2004).

Several species are well known for their therapeutic properties, being used in the folk medicine of some countries (Corrêa, 1984). The tea of their crushed leaves is used to treat throat inflammation (Viegas *et al*, 2007) and constipation (Leng-Peschlow, 1993). Also, they are known to be a rich source of phenolic derivatives, most of them with important biological and pharmacological properties (Hazra *et al*, 2004).

Although, in recent decades, many studies have been published regarding the pharmacological and biological properties of *Senna* extracts (Viegas *et al*, 2006), just a little is known about *Senna macranthera* (Colladon) H. Irwin & Barneby. This specie is native to Brazil and also grows in Colombia, Equador, Peru and Venezuela. The phytochemical studies on the endosperm of its seeds revealed the presence of a galactomannan, a sulphated derivative of which presented anticoagulant activity (Pires *et al*, 2001). In another study, Branco *et al* (2000) isolated the polyketide rubrofusarin, a human topoisomerase II- α inhibitor.

Due to the widespread medicinal use of *Senna*, the focus of this study was to investigate the anti-inflammatory, the laxative activities and the effect on intestinal motility of the extracts of *S. macranthera*. Moreover, their antioxidant activity and phytochemical profile were also determined.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

S. macranthera leaves were collected in Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil, in July, 2007. The plant was identified by Dr Fatima Regina Salimena. A voucher specimen (CESJ 46159) was deposited at the Herbarium Leopoldo Krieger of Federal University of Juiz de Fora.

2.2. Preparation of the extracts

Oven dried and powdered leaves of the plant (2.5 kg) were extracted by maceration with methanol (3 x 3 l) for five days at room temperature. The crude extract (400 g), after removal of solvent, was dissolved in MeOH-H₂O (8:2) and partitioned with hexane, dichloromethane (CH₂Cl₂), ethyl acetate (EtOAc) and, *n*-butanol (*n*-BuOH) successively to give hexane (28 g), CH₂Cl₂ (12 g) EtOAc (16 g) and *n*- BuOH (28 g) extracts. The solvents were evaporated and kept in tightly stoppered bottles under refrigeration until used for the biological testing and phytochemical analysis.

2.3. Phytochemical screening

A portion of each sample that was subjected to biological screening was used for the identification of the major secondary metabolites employing the protocols described by Matos (1997).

2.4. Amount of total phenolic compounds and flavonoids

The amount of phenolic compounds in plant extracts was determined by Folin-Denis method (Duh and Yen, 1997). Tannic acid was used as the standard for a calibration curve. One ml of the samples re-suspended in ethanol (0.5 mg/ml) was mixed thoroughly with 1 ml of the Folin-Denis reagent and 8 ml of Na₂CO₃ 2% in 0.1N NaOH. After a 60 min incubation period at 30 °C, the absorbance was read against a blank at 730 nm. All determinations were performed in triplicate. Total content of phenolic compounds was expressed in mg/g plant extracts in tannic acid equivalents (TAE).

The amount of flavonoids was determined as previously described by Miliauskas *et al* (2004) with slight modifications. Rutin was used as the standard for a calibration curve. One ml of plant extracts was re-suspended in methanol (0.5 mg/ml) and mixed with 1 ml of 2% aluminum trichloride in ethanol. The mixture was diluted with ethanol to 25 ml and allowed to stand for 40 min at 20 °C. Thereafter its absorbance was measured at 415 nm. The blank was prepared from 1 ml of the plant

extracts and one drop of acetic acid diluted to 25 ml in ethanol. All determinations were performed in triplicate. Total amount of flavonoids was expressed in mg/g plant samples, in rutin equivalents (RE).

2.5. HPLC analysis

Liquid chromatography was performed using an Agilent 1200 machine. The extracts were applied using an automatic injector and separated on a Zorbax SB-C18 column, 250 x 4.6 mm at 25 °C. The mobile phase was a gradient system with acetonitrile/water pH 3.8 with acetic acid as follows: 0-20 min: 90:10; 20-30 min: 70:30; 30-40 min: 20:80. The flow rate was 1 ml/min and for detection a DAD was used.

2.6. Antioxidant activity

2.6.1. DPPH assay

The free radical scavenging activity of extracts (Sigma, St. Louis, MO, USA) solutions in methanol was determined based on their ability to react with stable 1-1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical (Sigma) (Govindarajan *et al*, 2003). The plant samples at various concentrations (7.8 to 250 µg/ml) were added to a 152 µM solution of DPPH in methanol. After incubation at 37 °C for 30 min, the absorbance of each solution was determined at 517 nm. The antioxidant activity of the samples was expressed as IC₅₀, which was defined as the concentration (in µg/ml) of sample required to inhibit the formation of DPPH radicals by 50%. It was calculated by linear regression analysis and expressed as means of three determinations. Rutin and quercetin were used as positive control.

2.6.2. Reducing power

The reducing power was determined by the method of Oyaku (1986). Ten mg of each sample were mixed with 2.5 ml of potassium phosphate buffer (0.2 M, pH 6.6) and 2.5 ml of potassium ferricyanide (10 g/l). The mixture was incubated at 50 °C for 20 min. A 2.5 ml aliquot of 10% trichloroacetic acid was added to the mixture, which was then centrifuged at 3 000 g for 10 min. The upper layer of the solution (2.5

ml) was mixed with 2.5 ml distilled water and 0.5 ml 0.1% FeCl₃ and absorbance was measured at 700 nm. Ascorbic acid was used as reference material. All tests were performed in triplicate. Increase in absorbance of the reaction indicated the reducing power of the samples. A higher absorbance indicated a higher reducing power. EC₅₀ values (µg/ml) were calculated and indicate the effective concentration at which the absorbance was 0.5 for reducing power.

2.7. Animals

Male Wistar rats of 60 days in age, weighing 160 – 200 g, obtained from the Reproduction Biology Center of the Federal University of Juiz de Fora, were housed in a room kept under controlled conditions with temperature maintained at 23 °C ± 2 °C, on a 12h light: 12h dark cycle and free access to water and complete commercial chow (Nuvital™, Colombo, PR, BR). Throughout the experiments, animals were processed according to the suggested ethical guidelines for the care of laboratory animals.

2.8. Drugs and chemicals

Bisacodyl (Dulcolax®) and sodium diclofenac were obtained from Boehringer Ingelheim and Medquímica, respectively. Commercial senna (Pharmacopeia®) was purchased from local market. Emodin, atropine sulphate, carrageenan and DPPH were from Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO). All other chemicals used were of analytical grade.

2.9. Effect on intestinal motility

The method described by Jansen and Jageneau (1957) and Wong and Wai (1981) was used to test the effect of the extracts on intestinal motility.

The animals were divided into nine groups ($n = 7$) as follows:

Group I: received atropine sulphate (1 mg/kg ev);

Group II: reference group received bisacodyl in saline (0.25 mg/kg);

Group III: negative control received normal saline orally;

Group IV: received methanolic extract of commercial senna;

Group V: received methanolic extract of *S. macranthera*;

Group VI: received hexane extract;

Group VII: received dichlorometane extract;

Group VIII: received ethyl acetate extract;

Group IX: received *n*-butanol extract.

The animals were starved for 12 h prior to the experiment, but were allowed free access to water. All extracts were re-suspended in saline (400 mg/kg/ml) and administered orally, by gavage (1 ml). After 40 min, 1 ml of 10% charcoal suspension in 5% acacia solution was administered to each animal orally. The animals were sacrificed after 20 min and the abdomens were opened. The small intestines were dissected out and placed on a clean surface. The distance traveled by the charcoal meal from the pylorus was measured. The entire length of the small intestine was measured then the percentage distance traveled by the charcoal plug along the small intestine (from the pylorus to the caecum) was estimated for the extracts, control and the reference drug.

2.10. Laxative activity

The test as performed according to Capasso *et al* (1986) on rats fasted for 8 hours before the experiment, but with water provided ad libitum. The animals were divided into nine groups ($n = 7$) as follows:

Group I: received atropine sulphate (1 mg/kg ev);

Group II: reference group received bisacodyl in saline (0.25 mg/kg);

Group III: negative control received normal saline orally;

Group IV: received methanolic extract of commercial senna;

Group V: received methanolic extract of *S. macranthera*;

Group VI: received hexane extract;

Group VII: received dichlorometane extract;

Group VIII: received ethyl acetate extract;

Group IX: received *n*-butanol extract.

All extracts were re-suspended in saline (400 mg/kg/ml) and administered orally, by gavage (1 ml). Immediately after dosing, the animals were separately placed in cages suitable for collection of the feces. After 8 h of drug administration,

the feces were collected and weighed. Thereafter, food and water were given to all rats and fecal outputs were again weighed after a period of 16 h.

2.11. Anti-inflammatory activity

Carrageenan-induced hind paw edema model was used for determination of anti-inflammatory activity (Winter *et al*, 1962; Saha *et al*, 2007). The rats fasted for 8 hours before the experiment, but with water provided ad libitum, were divided into four groups ($n = 7$) as follows:

Group I: negative control received normal saline orally;

Group II: reference group received standard drug sodium diclofenac (10 mg/Kg)

Group III: received methanolic extract of *S. macranthera* (400 mg/kg);

Group IV: received hexane extract of *S. macranthera* (400 mg/kg).

The control saline, extracts and standard drug were administered 60 min prior to the administration of carrageenan (0.1 ml of 1% w/v solution in physiological saline) into subplantar tissue of the left hind paw. As the control, 1 ml saline solutions were injected into tissue of the right paw. The paw sizes were measured using a pachimeter immediately and thereafter at hourly intervals, for 4 h, following administration of carrageenan. Results were determined as percentage inhibition of edema and were compared to the control.

2.12. Statistical analysis

Values are presented as means \pm SEM. Statistical differences between the treatments and the controls were tested by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Dunnett test using the "GraphPad Prism 4" statistic computer program. A difference in the mean values of $P < 0.05$ was considered to be statistically significant. The IC_{50} and EC_{50} value at 95% confidence interval for antioxidant activity and reducing power, respectively, were calculated using a linear regression curve.

3. Results

3.1. Phytochemical screening

The results of the phytochemical screening of the extracts are given in Table 1.

Table 1- Phytochemical constituents of the extracts of *Senna macranthera*

Extracts	Phytochemicals ^a									
	Al	Tr	St	Sa	C	Ph	Ta	F	An	Fan
Methanol	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Hexane	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-
CH ₂ Cl ₂	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-
EtOAc	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-
<i>n</i> -BuOH	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-
Hydromethanol	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-

^aPhytochemicals key: Al, Alkaloids; Tr, Triterpenoids; St, Sterols; Sa, Saponins; C, Coumarins; Ph, Phenols; Ta, Tannins; F, Flavonoids; An, Anthrones; Fan, Free anthraquinones.

3.2. Antioxidant activity and amount of total phenolic compounds and flavonoids

The antioxidant activity and amount of total phenolic compounds and flavonoids are shown in Table 2.

Table 2- Antioxidant activity and amount of phenolic compounds and flavonoids of the extracts of *Senna macranthera*

Extracts	DPPH assay IC ₅₀ (µg/ ml) ^a	Reducing power EC ₅₀ (µg/ ml) ^b	Total phenolics as tannic acid equivalents (mg/g of extract) ^b	Flavonoids as rutin equivalents (mg/g extract) ^b
Methanol	11.5 ± 1.8		270.4 ± 0.014	430.2 ± 0.007
Hexane	59.1 ± 2.2		28.1 ± 0.015	55.0 ± 0.011
CH ₂ Cl ₂	23.3 ± 2.4		382.0 ± 0.013	196.0 ± 0.024
EtOAc	4.2 ± 3.1		547.0 ± 0.025	198.52 ± 0.0065
<i>n</i> -BuOH	39.4 ± 2.2		395.8 ± 0.045	109.18 ± 0.004
Ascorbic acid ^c		25.2 ± 0.23		
Rutin	2.5 ± 0.1			
Quercetin	0.9 ± 0.06			

^a 95% confidence limits in parenthesis.

^b Mean of triplicate assays ± SE.

^c Positive controls

3.3. HPLC analysis

The HPLC profiles of the extracts of *S. macranthera* and also that of commercial *senna* are presented in Figure 1. Emodin (1,3,8-trihydroxyanthraquinone) was used as reference

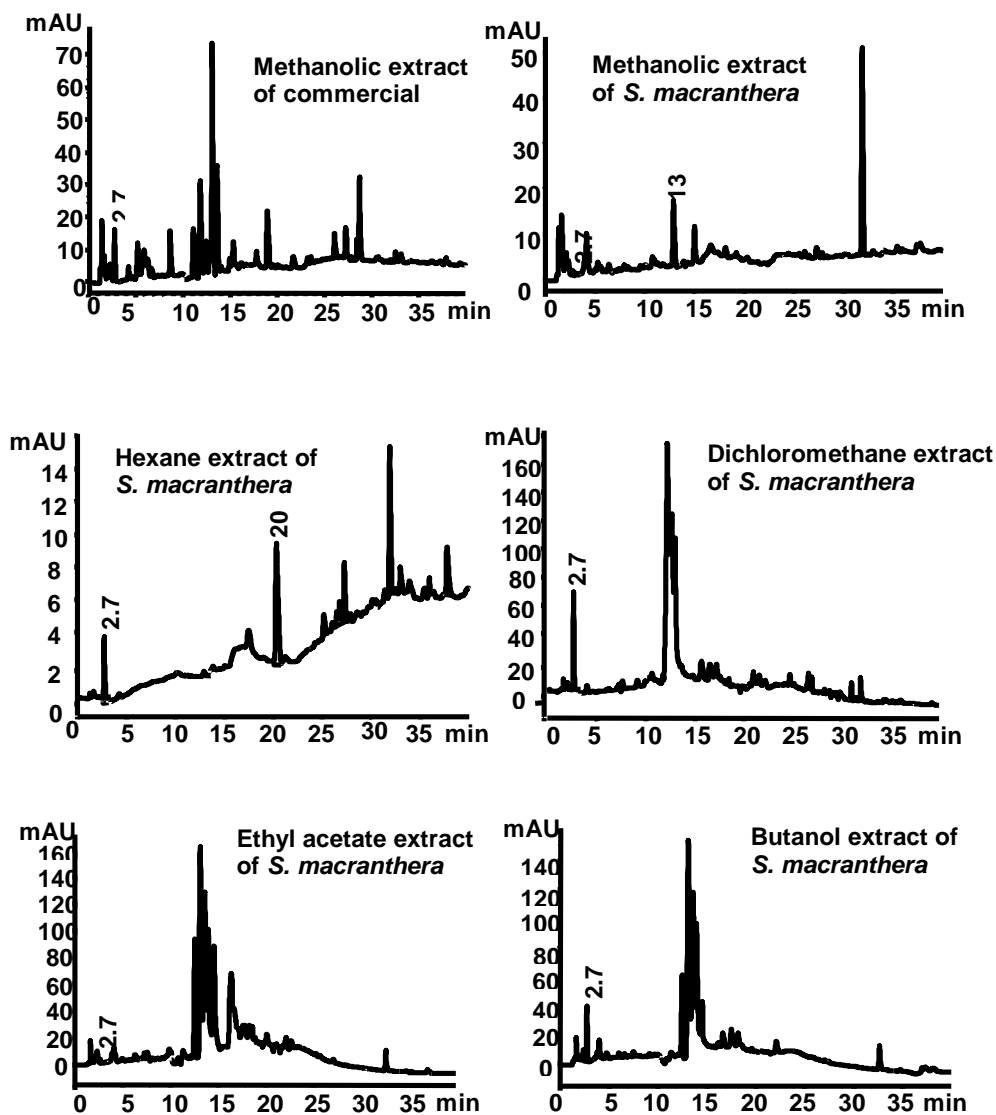


Figure 1: The HPLC profiles of the extracts of *S. macranthera* and commercial senna. Column Zorbax SB-C18; solvent system: acetonitrile/water pH 3.8 with acetic acid as follows: 0-20 min: 90:10; 20-30 min: 70:30; 30-40 min: 20:80. The flow rate was 1 ml/min; detection at 270 nm; sample size: 1 mg dissolved in 1 ml stationary phase. Peak 1 = emodine, RT = 2.7 min.

3.4. Laxative activity

The results of the laxative effects of the extracts of *S. macranthera* are given in Figure 2. The effects of hexane and methanol extracts were as potent as the standard drugs.

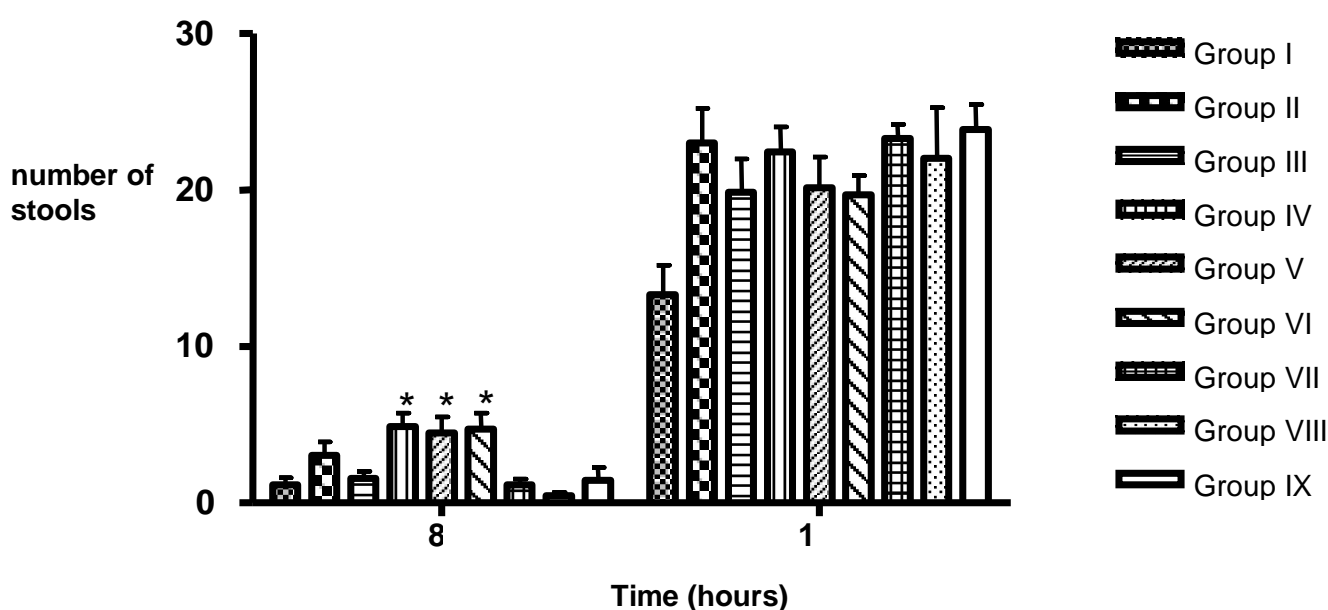


Figure 2- Laxative effect of the extracts of *Senna macranthera* in rats. Difference of means of the number of feces between control and treatment values \pm S.E.M ($n = 7$). Variation compared to the control animals. ANOVA followed by Dunnett- test * $P < 0.05$. Group I: atropine sulphate; group II: bisacodyl, group III: saline; group IV: MeOH extract of commercial senna; group V: MeOH extract of *S. macranthera*; group VI: hexane extract; group VII: EtOAc extract; group VIII: CH_2Cl_2 extract; group IX: *n*-BuOH extract.

3.5. Effect on intestinal motility

The effects of the extracts on intestinal motility were investigated. The results, as shown in Figure 3, reveal that the hexane extract of *S. macranthera* caused a

significant increase in gut motility when compared with the effect produced by normal saline and even with the effect of standard drugs.

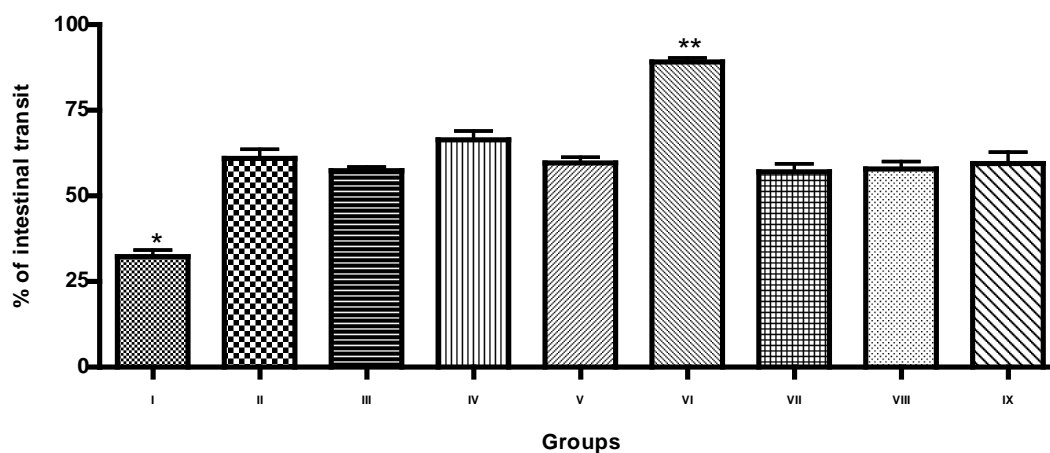


Figure 3- Effect of the extracts of *Senna macranthera* on intestinal motility in rats between control and treatment values \pm S.E.M ($n = 7$). Variation compared to the control animals. ANOVA followed by Dunnett- test $*P < 0.01$ and $**P < 0.05$. Group I: atropine sulphate; group II: bisacodyl, group III: saline; group IV: MeOH extract of commercial senna; group V: MeOH extract of *S. macranthera*; group VI: hexane extract; group VII: EtOAc extract; group VIII: CH_2Cl_2 extract; group IX: *n*-BuOH extract.

3.6. Anti-inflammatory activity

Results on the anti-inflammatory activity of hexane and methanol extracts of *S. macranthera* are shown in Figure 4. The hexane extract induced 58% edema inhibition in the studied period when compared to control. As reference, the non-steroidal anti-inflammatory drug, sodium diclofenac, reduced the edematous response by 75 % in that period.

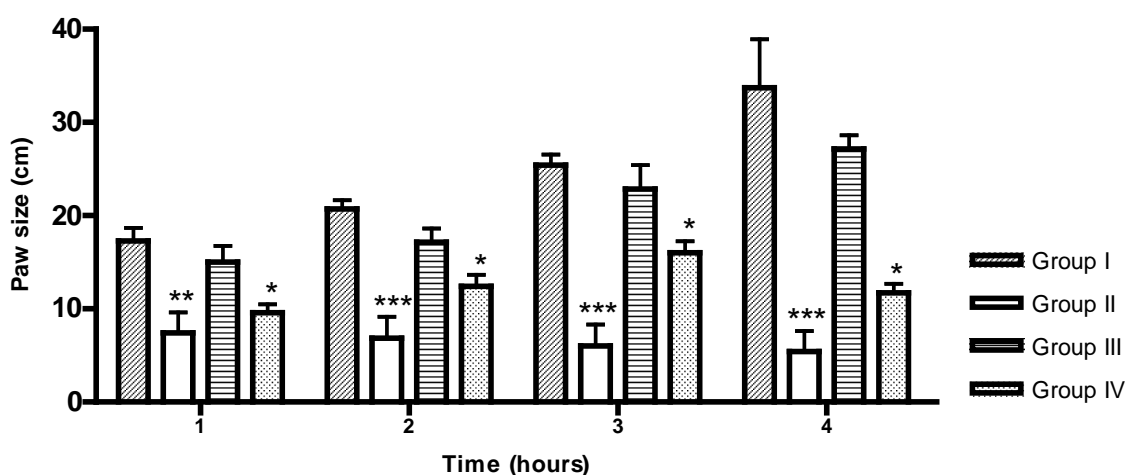


Figure 4- Effect of the extracts of *Senna macranthera* on carrageenan-induced hind paw edema in rats. Difference of means of paw size (cm) between control and treatment values \pm S.E.M ($n = 7$). Variation compared to the control animals. ANOVA followed by Dunnett- test * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$. Group I: saline; group II: sodium diclofenac, group III: MeOH extract of *S. macranthera*; group IV: hexane extract.

4. Discussion

The active principles of *Senna* use to be glycosides of the anthraquinone family. The intestinal bacteria flora accounts for the reduction of anthraquinones aglycons to their corresponding anthrones. They have been reported to accelerate spontaneous ileal contractions to induce purgative effect (Hara *et al*, 2008). The HPLC profile of the extracts showed the presence of the anthraquinone emodin in all extracts of *S. macranthera*, although in different amounts (Figure 1). Interestingly, the Borntraeger reaction used in this study to identify anthracene compounds did not detect anthraquinones in the extracts, probably because they are lower than the detection limit of the method. On the other hand, anthrones were identified in methanol and hexane extracts. Although piperidine alkaloids had been identified in several species of *Senna* (Viegas *et al*, 2004), they were not detected in the extracts of *S. macranthera* (Table 1). By the other side, except for the hexane, a great amount of phenolics, particularly flavonoids, were found in the extracts (Table 2).

Flavonoids have been used to treat many human diseases, such as diabetes, cancers and coronary heart diseases (Al-Dabbas *et al*, 2006). Moreover, flavonoids have been shown to exhibit the antioxidative, antiviral, antimicrobial and antiplatelet activities (Middleton *et al*, 2000). The biological activities of these polyphenols in different systems are believed to be due their redox properties, which can play an important role in absorbing and neutralizing free radicals, quenching singlet and triplet oxigens, or decomposing peroxides (Osawa, 1994). DPPH assays evaluate the ability of antioxidants to scavenge free radicals. Hydrogen-donating ability is an index of primary antioxidants. These antioxidants donate hydrogen to free radicals, leading to non-toxic species and therefore to inhibition of the propagation of lipid oxidation (Lugasi *et al*, 1998). The reducing power property indicates that these compounds are electron donors, and can reduce the oxidized intermediates of lipid peroxidation processes, so they can act as primary and secondary antioxidants (Yen and Chen, 1995).

Several studies have evaluated the relationships between antioxidant activities of extracts and their phenolic contents. Some authors found a correlation between the phenolic content and the antioxidant activity, while others found no relationship. Fabri *et al* (2009) reported a high correspondence between phenolic content and antioxidant activity using DPPH and reduction power assays in *Mitracarpus frigidus*. On the other hand, in this work, the findings did not show relationship between antioxidant activity and phenolic contents (Table 2). These results agree with those of Conforti *et al* (2009), who reported that differences in antioxidant activities of plant extracts could be due to different qualitative and quantitative compositions of their phenolic constituents.

In the present study, an oral administration of the hexane and methanol extracts of *S. macranthera* presented a laxative effect on rats. These extracts significantly increased the stool number 0-8 h after their administration. The laxative activities of these extracts were similar to that of commercial senna and greater than the reference drug, bisacodyl. The animals treated with the hexane extract produced wet or unformed feces. After 16 hour, no difference in the amount of feces was observed between the different treatments, including saline and standard drugs (Figure 2). This probably occurred because after 8 h of treatment, animals were allowed free access to food and the extracts and standard drugs had already acted in the first 8 h of treatment.

Interestingly, during the study period, only the hexane, but not the methanol extract, presented an increase on the intestinal motility of rats when compared to standard drugs (Figure 3). This is probably due to a difference in the chemical structure or concentration of the relaxant constituents of the two extracts, which can be confirmed by the HPLC chromatogram of both (Figure 1). Certainly, emodin contributed to the observed laxative and intestinal motility activities, but this compound was not the only one responsible for those activities as it was found in a greater amount in the inactive extracts (Figure 1).

Carrageenan induced rat paw edema is a well accepted and popular model for evaluating anti-inflammatory activity. It is known to produce a biphasic response, where the early phase is related to the production of histamine, leukotrienes, PAF and possibly cyclooxygenase products, while the delayed phase is linked to the neutrophil infiltration, eicosanoid release, production of free radicals and also release of other neutrophil derived mediators (Kumar *et al*, 2008). This study evaluates the anti-inflammatory effect of the hexane and methanolic extract of *S. macranthera*. The results demonstrate that the hexane extract possesses significant anti-inflammatory activity on an acute inflammatory process comparable to sodium diclofenac, being more potent in the first hour. In agreement with data from the literature, the paw edema induced by the carrageenan injection is associated with three different phases from alterations of the vascular permeability induced by mediators. During the first 60 min, possibly histamine and serotonin release occurs. A second phase is characterized by release of bradykinin and prostaglandins (mainly PGE₂) (Khalil *et al*, 2006; Pramanik *et al*, 2005). The anti-inflammatory effect observed for the hexane extract may be due the presence of triterpenoids and steroids in its composition (Table 1).

In conclusion, this work reveals that *S. macranthera* is an interesting source of anti-inflammatory, laxative and antioxidant principles which confirms its popular use.

Acknowledgement

The authors are grateful to Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and to Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) for financial support, to Dr Fatima Regina Salimena for the botanical identification of the species,

to the Center for Reproduction Biology of the Federal University of Juiz de Fora for providing the rats.

References

Agarkar, S. V., Judge, D. R., 1999. Phytochemical and pharmacological investigations of genus *Cassia*: A review. *Asian Journal of Chemistry* 11, 295 - 299.

Al-Dabbas, M., Suganuma, T., Kitahara, K., Hou, D., Fujii, M., 2006. Cytotoxic, antioxidant and antibacterial activities of *Varthemia iphionoides* Boiss. extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 108, 187-193.

Branco, A., Pinto, A.C., Braz-Filho, R., Silva, E.F., Grynberg, N.F., Echevarria, A., 2008. Rubrofusarin, a natural polyketide as new human topoisomerase II- α inhibitor. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 18,703 - 708.

Capasso, F., Mascolo, N., Autore, G., Romano, V., 1986. Laxatives and the production of autacoids by rat colon. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 38, 627 - 629.

Conforti, F., Rigano, D., Menichini, F., Houghton, P. J., 2009. In vivo anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of Mediterranean dietar plants. *Journal of Medicinal Chemistry* 52, 484 - 491.

Corrêa, P.M., 1984. Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Brasil, pp. 474 - 475.

Duh, P.D., Yen, G.C., 1997. Antioxidative activity of three water extracts. *Food Chemistry* 60, 639 - 645.

Fabri, R.L., Nogueira, M.S., Braga, F.G., Coimbra, E.S., Scio, E., 2009. *Mitracarpus frigidus* aerial parts exhibited potent antimicrobial, antileishmanial, and antioxidant effects. *Bioresource Technology* 100, 428 – 433

Govidarajan, R., Rastogi, S., Vijayakumar, M., Shirwaikar, A., Rawat, A.K.S., Mehrotra, S., Pushpangadan, P., 2003. Studies on the antioxidant activities of *Desmodium gangeticum*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 26, 1424 - 1427.

Hara, A.K., Leighton, J.A., Sharma, V.K., Fleischer, D.E., 2008. Purgative bowel cleansing combined with simethicone improves capsule endoscopy imaging. *American Journal of Gastroenterology* 103, 77 - 82.

Hazra, B., Das Sarma, M., Sanyal, U., 2004. Separation methods of quinonoi constituents of plants used in Oriental traditional medicines. *Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 812, 259 - 275.

Jansen, P., Jageneau, A. H., 1957. A new series of potent analgesics. Part I - Chemical structure and pharmacological activity. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 9, 381 - 400.

Khalil, N.M., Sperotto, J.S., Manfron, M.P., 2006. Anti-inflammatory activity of the hydroalcoholic extract of leaves of *Sida rhombifolia* L. (Malvaceae). *Acta Farmaceutica Bonaerense* 25, 260 - 261.

Kumar, K.T.M.S., Gorais, B., Roy, D.K., Zothanpuia, Samanta, S.K., Pal, M., Biswas, P., Roy, A., Adhikari, D., Karmakar, S., Sen, T., 2008. Anti-inflammatory activity of *Acanthus ilicifolius*. *Journal of Ethnopharmacology* 120, 7 - 12.

Leng-Peschlow, E., 1993. Sennoside-induced secretion and its relevance for the laxative effect. *Pharmacology* 47, 14 - 21.

Lugasi, A., Dworschák, E., Blázovics, A., Kéry, A., 1998. Antioxidant and free radical scavenging properties of squeezed juice from black radis (*Raphanus sativus* L. var *niger*) root. *Phytotherapy Research* 12, 502 - 506.

Matos, F.J.A., 1997. *Introdução à Fitoquímica Experimental*, UFC, Fortaleza.

Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T.C., 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacology Review* 52, 673 - 750

Miliauskas, G., Venskutonis, P.R., Van-Beek, T.A., 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and plant extracts. *Food Chemistry* 85, 231 - 237.

Osawa, T., 1994. Novel natural antioxidants for utilization in food and biological systems, in: Uritany, I., Garcia, V.V., Mendoza, E.M. (Eds.), *Postharvest Biochemistry of Plant Food-Materials in Tropics*, Japan Scientific Society Press: Tokyo, pp. 241-251.

Oyaku, M., 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of Nutrition* 44, 307 - 315.

Pires, L., Gorin, P.A.J., Reicher, F., Sierakowski, M.R., 2001. An active heparinoid by sulphation of a galactomannan extracted from endosperm of *Senna macranthera* seeds. *Carbohydrate Polymers* 46, 165 -169.

Pramanik, K.C., Bhattacharya, P., Chatterjee, T.K., Mandal, S.C., 2005. Anti-inflammatory activity of methanol extract of *Albizia lebbeck* (Mimosaceae) bark. *European Bulletin of Drug Research* 13, 71 – 76.

Saha, A., Masud, M.A., Bachar, S.C., Kundu, J.K., Datta, B.K., Nahar, L., Sarker, S.D., 2007. The analgesic and anti-inflammatory activities of the extracts of *Phyllanthus reticulatus* in mice model. *Pharmacy and Biology* 45, 355-359.

Viegas Jr, C., Bolzani, V.S., Furlan, M., Barreiro, E.J., Young, M.C.M., Tomazela, D., Eberlin, M.N., 2004. Further piperidine alkaloids from flowers and green fruits of *Cassia spectabilis*. *Journal of Natural Products* 67, 908 - 910.

Viegas Jr, C., Rezende, A., Silva, D.H.S., Castro-Gambôa, I., Bolzani V.S., 2006. Aspectos químicos, biológicos e etnofarmacológicos do gênero *Cassia*. Química Nova 29, 1279 - 1286.

Viegas Jr, C., Silva, D.H.S., Pivatto, M., Rezende, A., Castro-Gamboa, I., Bolzani, V.S., Muraleedharan, N.G., 2007. Lipoperoxidation and cyclooxygenase enzyme inhibitory piperidine alkaloids from *Cassia spectabilis* green fruits. Journal of Natural Products 70, 2026 - 2028.

Winter, C.A., Risley, E.A., Nuss, G.W., 1962. Carrageenan induced edemas in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. Society for Experimental Biology and Medicine 111, 544 - 547.

Wong, C. L., Wai, M. K., 1981. Effects of aspirin and paracetamol on naloxone reversal or morphine-induced inhibition of gastrointestinal propulsion in mice. European Journal of Pharmacology 73, 11 - 19.

Yen, G. C., Chen, H. Y., 1995. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. Journal of Agricultural and Food Chemistry 43, 27 - 32.

LEGENDS

Figure 1: The HPLC profiles of the extracts of *S. macranthera* and commercial senna. Column Zorbax SB-C18; solvent system: acetonitrile/water pH 3.8 with acetic acid as follows: 0-20 min: 90:10; 20-30 min: 70:30; 30-40 min: 80:20. The flow rate was 1 ml/min; detection at 270 nm; sample size: 1 mg dissolved in 1 ml stationary phase. Peak 1 = emodine, RT = 2.7 min.

Figure 2- Laxative effect of the extracts of *Senna macranthera* in rats. Difference of means of the number of faeces between control and treatment values \pm S.E.M ($n = 7$). Variation compared to the control animals. ANOVA followed by Dunnett- test * $P < 0.05$. Group I: atropine sulphate; group II: bisacodyl, group III: saline; group IV: MeOH extract of commercial senna; group V: MeOH extract of *S. macranthera*; group VI: hexane extract; group VII: EtOAc extract; group VIII: CH₂Cl₂ extract; group IX: *n*-BuOH extract.

Figure 3- Effect of the extracts of *Senna macranthera* on intestinal motility in rats between control and treatment values \pm S.E.M ($n = 7$). Variation compared to the control animals. ANOVA followed by Dunnett- test * $P < 0.01$ and ** $P < 0.05$. Group I: atropine sulphate; group II: bisacodyl, group III: saline; group IV: MeOH extract of commercial senna; group V: MeOH extract of *S. macranthera*; group VI: hexane extract; group VII: EtOAc extract; group VIII: CH₂Cl₂ extract; group IX: *n*-BuOH extract.

Figure 4- Effect of the extracts of *Senna macranthera* on carrageenan-induced hind paw edema in rats. Difference of means of paw size (cm) between control and treatment values \pm S.E.M ($n = 7$). Variation compared to the control animals. ANOVA followed by Dunnett- test * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$. Group I: saline; group II: sodium diclofenac, group III: MeOH extract of *S. macranthera*; group IV: hexane extract.