UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Avaliação da atividade antimicrobiana e da
citotoxicidade de extratos aquosos e hidroalcoólicos de
Senna occidentalis L. (LinK)

Márcia Lombardo

Orientador:
Prof.^a Dr.^a Telma Mary Kaneko

São Paulo
2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Avaliação da atividade antimicrobiana e da citotoxicidade
de extratos aquosos e hidroalcoólicos
de *Senna occidentalis* L. (Link)

Márcia Lombardo

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof.^a Dr.^a Telma Mary Kaneko

São Paulo
2008
19395

DEDALUS - Acervo - CQ

30100014912

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Lombardo, Márcia
L841a Avaliação da atividade antimicrobiana e da citotoxicidade
de extratos aquosos e hidroalcoólicos de *Senna occidentalis* L.
(LinK) / Márcia Lombardo. -- São Paulo, 2008.
115p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Kaneko, Telma Mary

1. Produtos naturais : Farmacognosia 2. Produtos naturais :
Cosmetologia : Tecnologia I. T. II. Kaneko, Telma Mary,
orientador.

615.321 CDD

Márcia Lombardo

Avaliação da atividade antimicrobiana e da citotoxicidade de extratos
aquosos e hidroalcoólicos de *Senna occidentalis* L. (Link)

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof.^a Dr.^a Telma Mary Kaneko
orientador/presidente

1.º examinador

2.º examinador

São Paulo, 12 de junho de 2008.

Janus

Universidade de São Paulo

RELATÓRIO DE DEFESA

Aluno: 9139 - 5763394 - 1 / Página 1 de 1

Relatório de defesa pública de Dissertação do(a) Senhor(a) Marcia Lombardo no Programa: Fármaco e Medicamentos, do(a) Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Aos 12 dias do mês de janeiro de 2009, realizou-se a Defesa da Dissertação do(a) Senhor(a) Marcia Lombardo, apresentada para a obtenção do título de Mestre intitulada:

"Avaliação da atividade antimicrobiana e da citotoxicidade de extratos aquosos e hidroalcoólicos de *Senna occidentalis* L. (Link)"

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra ao candidato para exposição e a seguir aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

Nome dos Participantes da Banca	Função	Sigla da Unidade	Resultado
Telma Mary Kaneko	Presidente	FCF - USP	Aprovada
Adriana Bugno	Titular	Externo	APROVADA
Nilsa Sumie Yamashita Wadt	Titular	UMC - Externo	Aprovada

Resultado Final:

Parecer da Comissão Julgadora *

Eu, Kelma Lydis Oliveira Alves Guitman, lavrei a presente ata, que assino juntamente com os(as) Senhores(as). São Paulo, aos 12 dias do mês de janeiro de 2009.

Adriana Bugno

Nilsa Sumie Yamashita Wadt

Telma Mary Kaneko
Presidente da comissão julgadora

* Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

O título foi homologado pela Comissão de Pós-Graduação em 14/01/09 e, portanto, o(a) aluno(a) faz jus ao título de Mestre em Fármaco e Medicamentos obtido no Programa Fármaco e Medicamentos - Área de concentração: Produção e Controle Farmacêuticos.

Presidente da Comissão de Pós-Graduação

A meus pais, **Mauro e Maria Aparecida**,
com muito carinho e gratidão.

À **Marina, Mariana e Neide**,
tão especiais em minha vida.

À **Consciência Suprema**,
fonte inesgotável de Amor.

AGRADECIMENTOS

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa concedida (Processo 06/52668-1).

Prof.^a Dr.^a Telma Mary Kaneko (Lab. de Controle Biológico de Medicamentos e Cosméticos/Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP), pela oportunidade de realização deste projeto, orientação e suporte.

Dr.^a Sumika Kiyota (Lab. de Bioquímica de Proteínas e Peptídeos/Instituto Biológico/SP), pelo ensino, sugestões e auxílio na obtenção e caracterização dos extratos protéicos.

Dr. Francisco Romero Cabral (Escola Paulista de Medicina/SP), pela força e incentivo.

Marcos Enoque Leite Lima (Lab. de Química de Produtos Naturais/Instituto de Química/USP), pela preciosa ajuda e amizade.

Dr.^a Márcia Balistiero Figliolia (Lab. de Sementes/Instituto Florestal/SP), pela generosidade e doação de sementes.

Prof.^a Dr.^a Edna Tomiko Miyake Kato (Lab. de Biofarmacognosia/Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP), pela calma, atenção e auxílio na obtenção e caracterização dos extratos hidroalcoólicos.

Carlos Alberto Theodoro Siqueira (Lab. de Biofarmacognosia/Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP), pelo esforço e prontidão.

Prof.^a Dr.^a Monica Beatriz Mathor e Dr.^a Patrícia Santos Lopes (Lab. de Cultura Celular/Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares/USP), pela paciência e auxílio na avaliação da citotoxicidade.

Daniele Yoshito (Lab. de Cultura Celular/Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares/USP), pela dedicação.

Prof. Dr. Maurício da Silva Baptista (Lab. de Processos Fotoinduzidos e Interfaces/Instituto de Química/USP), por gentilmente colocar o laboratório a disposição.

Ms. Carla Aparecida Pedriali (Lab. de Processos Fotoinduzidos e Interfaces/Instituto de Química/USP), pela bondade e auxílio na avaliação preliminar da atividade antioxidante dos extratos.

Prof.^a Dr.^a Vladi Olga Consiglieri (Lab. Farmacotécnica/ Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP), por apresentar as alunas de iniciação científica.

Dr.^a Lúcia Baldassi (Lab. de Bacteriologia/Instituto Biológico/SP), **Dr.^a Vera Cecília Annes Ferreira** e **Alice Akimi Ikuno** (Lab. Imunologia/Instituto Biológico/SP) pelo auxílio e compreensão.

Prof.^a Dr.^a Terezinha de Jesus Andreoli Pinto (Lab. de Controle Biológico de Medicamentos e Cosméticos/Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP), pela receptividade, atenção e precisão.

Dr.^a Helena Onishi Ferraz (UNISO/Sorocaba/SP) pelas sugestões e correções.

Adriana de Almeida Barreiros e **Leila Aparecida Bonadio** (Biblioteca do Conjunto das Químicas/USP) pelo auxílio no levantamento de dados e revisão das referências bibliográficas.

Agradeço aos colegas de laboratório e de disciplinas, pelo apoio e pelas dicas: **Elissa Arantes Ostrosky**, **Fábio Luiz Camacho Pacheco**, **José de Sousa Sobrinho**, **Hélio Sálvio Neto**, **Siliane Bertoni Kalkaslied de Souza**, **Miriam Cristina Sakuragui Matuo**, **Irene Satiko Kikuchi**, **Juliano de Moraes Ferreira Silva**, **Delia Luna Pinto**, **Gabriele Wander Ruas**, **Beatriz Resende Freitas**, **Anderson Clayton Stevaux** e **André Rolim Baby**.

Agradeço a cooperação dos alunos de graduação **Tatiane Marques Carneiro** (Farmácia/USP), **Rafaella H. Martins** (Escola Politécnica/USP), **Fábio Luís Munakata** (Farmácia/USP), **Priscila Gasparetto** (Farmácia/Faculdade Oswaldo Cruz/SP) e de todas as pessoas que estiveram envolvidas neste trabalho, seja de forma direta ou indireta.

Obrigada aos membros da **Banca Examinadora**, pela atenção dispensada.

“A realidade é uma ilusão,
embora bastante persistente.”
(Albert Einstein)

Avaliação da atividade antimicrobiana e da citotoxicidade de extratos aquosos e hidroalcoólicos de *Senna occidentalis* L. (Link)

RESUMO

A *Senna occidentalis* é uma leguminosa nativa das Américas largamente distribuída e utilizada popularmente em regiões tropicais do mundo, apresentando relevância na busca de novos produtos naturais biologicamente ativos. O presente trabalho teve como objetivo a avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de extratos aquosos das sementes e suas frações protéicas, bem como dos extratos hidroalcoólicos das sementes e das partes aéreas dessa planta, visando a sua utilização em preparações tópicas. As atividades antibacteriana e antifúngica, frente aos microrganismos padrões farmacêuticos, foram avaliadas pela técnica de diluição em meios líquidos, adaptada para microplacas. A citotoxicidade das amostras ativas foi avaliada pelo teste do MTS, empregando-se cultura de fibroblastos NIH-3T3. Como resultado, o extrato hidroalcoólico de sementes a 0,3% (p/v) foi o que melhor demonstrou potencial antimicrobiano, além de toxicidade adequada, podendo ser um candidato para o uso como um antimicrobiano ou conservante de preparações tópicas.

Palavras-chave:

Senna occidentalis. *Cassia occidentalis*. Fedegoso. Atividade antimicrobiana.

Antimicrobial activity and cytotoxicity evaluation of aqueous and hydro-alcoholic *Senna occidentalis* L. (Link) extracts

ABSTRACT

Senna occidentalis is a native leguminous from America widely spread in tropical regions of the world and employed in folk medicine, showing a great importance on the search of new bioactive natural products. The aim of the present work was to evaluate the antimicrobial and cytotoxic activities of the aqueous extract seeds' and its protein fractions, as well the hydro-alcoholic extracts seeds' and aerial parts from this plant, considering its possible use in topic preparations. The antibacterial and antifungal activities, against the pharmaceutical standard microorganisms, were evaluated by broth dilution technique, adapted to microplates. The cytotoxicity of active samples was evaluated by the cellular viability test with MTS employing NIH-3T3 fibroblasts cell culture. As a result, the hydro-alcoholic extract seeds' 0,3% (w/v) demonstrated a better antimicrobial potential and a suitable toxicity. In such case, this extract could be a candidate for the use as antimicrobial or preservative of topic preparations.

Keywords:

Senna occidentalis. *Cassia occidentalis*. Coffee weed. Antimicrobial activity.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABNT: Associação Brasileira de Normas Técnicas

A. niger: *Aspergillus niger*

AIDS: *Acquired Immunodeficiency Syndrome*

ATCC: *American Type Culture Collection*

Balb/C: linhagem de camundongo albino

B. cepacia: *Burkholderia cepacia*

BSA: *Bovine Serum Albumin*

C. occidentalis: *Cassia occidentalis*

C.albicans: *Candida albicans*

CCD: Cromatografia em Camada Delgada

D10: meio de cultura DMEM contendo 10% de soro fetal bovino

D/M: dimetilsulfóxido/metanol

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Media*

DMSO: dimetilsulfóxido

DPPH: difenilpicrilhidrazila

Dr.: Doutor

Dr.^a: Doutora

EBaq: extrato bruto aquoso de sementes de *Senna occidentalis*

EC₅₀: *Efficient Concentration required to induce a 50% effect*

E. coli: *Escherichia coli*

ed.: editor

E. floccosum: *Epidermophyton floccosum*

EHPA: extrato hidroalcoólico de partes aéreas de *Senna occidentalis*

EHS: extrato hidroalcoólico de sementes de *Senna occidentalis*

ELISA: *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

et al.: *et alli* (e outros)

FP25: primeira fração protéica de sementes de *Senna occidentalis* (fração 25%)

FP50: segunda fração protéica de sementes de *Senna occidentalis* (fração 50%)

FP75: terceira fração protéica de sementes de *Senna occidentalis* (fração 75%)

IC₁₀: *Inhibition Concentration that reduces the effect by 10%*

IC₅₀: *Inhibition Concentration that reduces the effect by 50%*

L. (Link): classificação botânica proposta primeiramente por Carl von Linné (L.) e posteriormente por Johann Heinrich Friedrich Link (Link)

Lab.: Laboratório

LDL: *Low Density Lipoprotein*

MH: *Müller Hinton*

MIC: *Minimal Inhibitory Concentration*

MM: Massa Molecular

MNTC: *Maximum Non-Toxic Concentration*

MTS: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio

MW: *Molecular Weight*

n.: número ou fascículo

n.º: número

NIH-3T3: célula embrionária do camundongo da linhagem *NIH Swiss* cultivadas de acordo com o protocolo 3T3: 3 dias de transferência das células e inoculação contínua na densidade de 3 x 10⁵ células

NP: *Natural Product* (difenilborato de aminoetanol)

ON: *over night*

p.: página

P. aeruginosa: *Pseudomonas aeruginosa*

PBS: *Phosphate Buffered Saline*

PDA: *Potato Dextrose Agar*

PEG: polietilenoglicol

pH: potencial hidrogeniônico

PMS: *phenazine methosulfate*

Prof.: Professor

Prof.^a: Professora

RDC: Resolução da Diretoria Colegiada

Rf: *retention factor*

RNS: *Reactive Nitrogen Species*

ROS: *Reactive Oxygen Species*

S. aureus: *Staphylococcus aureus*

So: *Senna occidentalis*

S. occidentalis: *Senna occidentalis*

SDA: *Sabouraud Dextrose Agar*

SDB: *Sabouraud Dextrose Broth*

sin: sinonímia

TA: temperatura ambiente

TLC: *thin layer chromatography*

***T. rubrum*:** *Trichophyton rubrum*

TSA: *Tryptic Soy Agar*

TSB: *Tryptic Soy Broth*

UFC: Unidade Formadora de Colônia

UH: Unidade Hemaglutinante

UI: Unidade Internacional

UR: Umidade Relativa

USP: Universidade de São Paulo

UV: ultravioleta

v.: volume

LISTA DE SÍMBOLOS

w/v: percent weight per volume

%: por cento

cm: centímetro

mm: milímetro

O₂: gás oxigênio

NO: óxido de nitrogênio

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

OH⁻: hidroxila ou oxidrila

° C: grau Celsius

v/v: porcentagem volume por volume

h: hora

M: molar

p/v: porcentagem peso por volume

min: minuto

EtOH: etanol

(NH₄)₂SO₄: sulfato de amônio

g/mol: grama por mol

BaCl₂: cloreto de bário

H₂O: água

mg/mL: miligrama por mililitro

MeOH: metanol

nm: nanômetro

KOH: hidróxido de potássio

N: normal

rpm: rotação por minuto

kDa: quilodalton

NaCl: cloreto de sódio

μL: microlitro

mM: milimolar

μM: micromolar

μm: micrômetro; micra (plural)

CO₂: dióxido de carbono; gás carbônico

g: grama

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Esquema da <i>Senna occidentalis</i> (<i>Cassia occidentalis</i>).....	5
Quadro 2. Exsicata da <i>Senna occidentalis</i>	6
Quadro 3. Folhas e flores de <i>Senna occidentalis</i>	7
Quadro 4. Fruto de <i>Senna occidentalis</i>	8
Quadro 5. Sementes de <i>Senna occidentalis</i>	8
Quadro 6. Sistemas <i>in vitro</i> que podem ser utilizados para a avaliação da atividade antioxidante	33
Quadro 7. Métodos de detecção que podem ser utilizados nos ensaios de avaliação da atividade antioxidante.....	34

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema de obtenção do extrato hidroalcoólico de partes aéreas de <i>S. occidentalis</i>	38
Figura 2. Esquema de obtenção dos extratos hidroalcoólicos e frações protéicas de sementes de <i>S. occidentalis</i>	39
Figura 3. Recuperação de <i>S. aureus</i> frente aos diluentes das amostras e padrão de antibiótico	51
Figura 4. Recuperação de <i>E. coli</i> frente aos diluentes das amostras e padrão de antibiótico	52
Figura 5. Recuperação de <i>P. aeruginosa</i> frente aos diluentes das amostras e padrão de antibiótico	52
Figura 6. Recuperação de <i>C. albicans</i> frente aos diluentes das amostras e padrão de antibiótico	53
Figura 7. Recuperação de <i>A. niger</i> frente aos diluentes das amostras e padrão de antibiótico	53
Figura 8. Atividade tóxica dos extratos hidroalcoólicos de <i>S. occidentalis</i> para fibroblastos	58
Figura 9. Curva-padrão de <i>trolox</i> -C: calibração do método de seqüestro de radicais DPPH.	60
Figura 10. Seqüestro de radicais DPPH pelos extratos protéicos e hidroalcoólicos de <i>S. occidentalis</i>	60

LISTA DE TABELAS

Tabela I – Rendimento da extração hidroalcoólica de partes de *S.occidentalis* e caracterização fitoquímica dos extratos47

Tabela II – Rendimento da extração de proteínas de sementes de *S. occidentalis*..48

Tabela III – Atividade hemaglutinante do extrato bruto aquoso e das frações protéicas de sementes de *S. occidentalis*, empregando hemácias humanas tipo O .50

Tabela IV – Atividade antimicrobiana dos extratos de *S. occidentalis*56

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1. <i>Senna occidentalis</i> (L.) Link ou <i>Cassia occidentalis</i>	4
2.1.1. Aspectos botânicos da <i>Senna occidentalis</i>	4
2.1.2. Aspectos étnicos da utilização da <i>Senna occidentalis</i>	9
2.1.3. Constituintes químicos da <i>Senna occidentalis</i>	11
2.1.4. A atividade antimicrobiana da <i>Senna occidentalis</i>	13
2.1.5. Outras propriedades farmacológicas da <i>Senna occidentalis</i>	15
2.1.6. Toxicidade da <i>Senna occidentalis</i>	17
2.2. Cosméticos e agentes conservantes	19
2.3. Atividade antimicrobiana	21
2.3.1. Microrganismos padrões farmacêuticos	21
2.3.2. Técnicas <i>in vitro</i> para a avaliação da atividade antimicrobiana	24
2.3.3. Condições experimentais para a avaliação da atividade antimicrobiana <i>in vitro</i>	25
2.4. Atividade tóxica e métodos <i>in vitro</i> para a sua avaliação	27
2.5. Atividade antioxidante	29
2.5.1. Radicais livres e substâncias antioxidantes	29
2.5.2. Técnicas <i>in vitro</i> para a avaliação da atividade antioxidante.....	32
3. OBJETIVOS	35
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1. Material	36
4.2. Métodos	36
4.2.1. Obtenção dos extratos de <i>Senna occidentalis</i>.....	36

4.2.1.1. Extração hidroalcoólica de partes aéreas e de sementes de <i>Senna occidentalis</i>	36
4.2.1.2. Extração de proteínas das sementes de <i>Senna occidentalis</i>	37
4.2.2. Caracterização físico-química dos extratos de <i>Senna occidentalis</i>	40
4.2.2.1. Cromatografia em camada delgada (CCD) dos extratos hidroalcoólicos	40
4.2.2.2. Determinação do conteúdo protéico do extrato bruto aquoso e das frações de sementes de <i>Senna occidentalis</i>	40
4.2.2.3. Teste de hemaglutinação do extrato bruto aquoso e das frações de sementes de <i>Senna occidentalis</i>	40
4.2.3. Screening da atividade antimicrobiana dos extratos de <i>Senna occidentalis</i>	41
4.2.3.1. Microrganismos	41
4.2.3.2. Meios de cultura e condições de incubação	42
4.2.3.3. Preparo e avaliação da viabilidade do inóculo	42
4.2.3.4. Controles positivos	42
4.2.3.5. Amostras	42
4.2.3.6. Ensaio da concentração mínima inibitória (MIC)	43
4.2.4. Avaliação da atividade citotóxica dos extratos hidroalcoólicos de <i>Senna occidentalis</i>	43
4.2.4.1. Linhagem celular	43
4.2.4.2. Amostras	44
4.2.4.3. Teste de viabilidade celular empregando MTS	44
4.2.5. Avaliação da atividade antioxidante dos extratos de <i>Senna occidentalis</i> pelo método do seqüestro do radical DPPH	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
6. CONCLUSÃO	62
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
ANEXOS	92

1. INTRODUÇÃO

Estimativas demonstram que cerca de 74% dos medicamentos convencionais da atualidade foram descobertos com base no uso tradicional e popular de substâncias da natureza. Neste cenário, o reino vegetal destaca-se como uma importante fonte de produtos naturais biologicamente ativos que podem ser usados como modelos para a síntese de um grande número de fármacos. No entanto, apenas 15 a 17% das espécies vegetais já foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal (O'NEILL e LEWIS, 1993; SOEJARTO, 1996; GUERRA e NODARI, 2004).

Os dados ainda revelam que pelo menos 12000 metabólitos secundários sintetizados pelas plantas já foram isolados, os quais representam menos que 10% do total existente. A maioria desses metabólitos desempenha um importante papel na defesa natural dos vegetais, constituindo um grupo de substâncias denominadas fitoalexinas. Neste grupo, os fenólicos são os compostos mais ocorrentes (SCHULTES, 1978).

Os mecanismos químicos de defesa do reino vegetal são a base dos antimicrobianos de origem natural. Com o advento dos antibióticos sintéticos na década de cinquenta, o uso de derivados vegetais como antimicrobianos foi praticamente inexistente. Devido ao surgimento de microrganismos resistentes e de infecções oportunistas fatais associadas a AIDS, quimioterapia antineoplásica e transplantes, a pesquisa de novos agentes antimicrobianos está crescendo (COWAN, 1999; PENNA *et al.*, 2001; IBARRA e JOHNSON, 2008).

Compostos fitoquímicos com atividade antimicrobiana são de particular interesse no setor de desenvolvimento de produtos farmacêuticos e/ou cosméticos, não só pela abrangência nos tratamentos terapêuticos, mas como substitutos da função conservadora das formulações.

A presença de uma carga microbiana inadequada em produtos farmacêuticos e cosméticos pode representar uma ameaça substancial para a saúde dos consumidores e também acarretar em alterações na estabilidade da formulação. Um sistema conservante deve eliminar o microrganismo contaminante ou inibir o seu crescimento. No entanto, ele não deve ser seletivo, pois, idealmente, tem a missão de “lutar” contra todos os microrganismos presentes – bactérias, leveduras e bolores. Paralelamente à capacidade conservante, o sistema não deve apresentar característica tóxica ou irritante. Assim, a eficácia e a segurança devem ser a

primeira prioridade de um agente conservante (PINTO, KANEKO e OHARA, 2003; IBARRA e JOHNSON, 2008).

Embora os ingredientes sintéticos freqüentemente exibam uma melhor performance que os naturais, eles não podem ser degradados ou absorvidos pelas estruturas biológicas. Em se tratando de medicamentos tópicos e fórmulas cosméticas, a pele aceita bem mais facilmente os ingredientes naturais do que os sintéticos. Por isso, o conceito “natural” tornou-se decisivo para o desenvolvimento de agentes ativos que são novos e potentes e ao mesmo tempo suaves e sustentáveis (IBARRA e JOHNSON, 2008).

As espécies vegetais pertencentes à família das leguminosas contêm substâncias químicas em quantidades suficientes para que sejam consideradas economicamente úteis como alimento ou matéria-prima, despertando um amplo interesse para inúmeras aplicações científicas, tecnológicas e comerciais (MORRIS, 1999).

O material de estudo do presente trabalho, *Senna occidentalis* L. (Link) (S. *occidentalis*) ou *Cassia occidentalis*, é uma leguminosa nativa das Américas e que apresenta uma distribuição pantrópica, principalmente como erva daninha de terrenos baldios e secos. Alguns dos nomes populares comumente associados a esta espécie são: *fedegoso* – devido ao seu odor característico; *café negro* – visto que as suas sementes são usadas para preparar uma bebida semelhante ao café e *mata-pasto* – por ser uma planta freqüentemente encontrada como contaminante de pastos e plantações (CORRÊA, 1926; COIMBRA, 1958).

Uma vasta literatura mostra que as sementes de *S. occidentalis* são tóxicas para animais que a ingerirem. O aparecimento de doenças miodegenerativas é o principal efeito da intoxicação, podendo levar à morte e resultar em grandes perdas econômicas na pecuária (HEBERT *et al.*, 1983; HUEZA *et al.*, 2007).

Na medicina popular, a *S. occidentalis* é largamente empregada por tribos americanas, indianas e africanas desde longa data, com uma grande variedade de usos, principalmente como tônico, febrífugo, estomáquico e purgativo. Esta espécie se destaca como uma importante droga da medicina indiana *Ayurvedica* para casos de desordens hepáticas e infecções da pele (CORRÊA, 1926; GAIND, BUDHIRAJA e KAUL, 1966; BARDHAN *et al.*, 1985).

Estudos científicos estão comprovando que a *S. occidentalis* possui inúmeras propriedades farmacológicas, tais como: antibacteriana, antifúngica, antiparasitária,

antimalárica, inseticida, antitumoral e hepatoprotetora. Nas análises fitoquímicas da planta, as antraquinonas, flavonóides e outros compostos fenólicos foram considerados os seus constituintes mais freqüentes (VIEGAS JR., 2006).

Segundo trabalhos anteriores, os extratos aquosos das sementes de *S. occidentalis* demonstraram a presença de componentes protéicos com propriedades biológicas relevantes, tais como antibacteriana e antiviral (LOMBARDO *et al.*, 2004a e 2004b).

Diversas classes de proteínas e peptídeos identificadas em espécies vegetais foram associadas aos seus mecanismos de defesa contra predadores, pragas, parasitas ou agentes patogênicos (BROEKAERT *et al.*, 1997). Peptídeos de origem vegetal inibidores de microrganismos foram reportados pela primeira vez por Balls, Hale e Harris em 1942 (COWAN, 1999). Com freqüência, essas macromoléculas possuem estruturas químicas carregadas positivamente e pontes dissulfeto (ZHANG e LEWIS, 1997). Segundo Sharon e Ofek (1986), o mecanismo de ação antimicrobiano de proteínas, peptídeos e lectinas (glicoproteínas) podem ser a formação de canais na membrana celular do microrganismo ou a inibição competitiva dos receptores polissacarídeos.

As investigações sobre a atividade antimicrobiana da *S. occidentalis* podem revelar um ativo ou agente conservante natural interessante de formulações farmacêuticas e cosméticas, podendo assim contribuir para o aproveitamento sustentável dos recursos do bioma e o desenvolvimento de produtos com toxicidade reduzida, de acordo com as expectativas do mercado atual.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. *Senna occidentalis* (L.) Link ou *Cassia occidentalis*

2.1.1. Aspectos botânicos da *Senna occidentalis*

As leguminosas fazem parte da terceira maior família das plantas com flores (Família *Leguminosae* ou *Fabaceae*), que possui aproximadamente 650 gêneros e cerca de 20000 espécies separadas em três grupos distintos; as subfamílias *Caesalpinieae*, *Mimosaceae* e *Papilionaceae*. As sementes de leguminosas são a segunda fonte vegetal mais importante de alimentação humana e animal (VIETMEYER, 1986; DOYLE, 1994; VIEGAS JR. *et al.*, 2006).

O gênero *Cassia* está inserido na família *Leguminosae* e é constituído por mais de 600 espécies, incluindo arbustos, árvores e ervas, distribuídas em regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo. Este gênero é muito freqüente nos ecossistemas brasileiros, particularmente na Mata Atlântica. Devido à beleza de suas flores, algumas espécies são muito apreciadas e utilizadas como plantas ornamentais na região sudeste (LORENZI, 1991; AGARKAR e JADGE, 1999).

As espécies de *Cassia*, juntamente com aquelas tendo sinonímia *Senna* ou que mudaram para o grupo *Senna* após o novo sistema de classificação taxonômica, formam um dos maiores gêneros da família das leguminosas. Diversos trabalhos mostram que este gênero apresenta um grande potencial farmacológico e destacam espécies como *Cassia auriculata*, *Cassia occidentalis* (**Quadro 1**), *Cassia obtusifolia*, *Cassia tora*, *Cassia alata*, *Cassia angustifolia*, *Cassia autifolia*, *Cassia nodosa*, *Cassia sophera*, *Cassia torosa*, *Cassia nigricans* e *Cassia cinnamon*, as quais apresentam grande utilização popular como laxativos e purgativos em algumas regiões da Ásia, como Índia e Ceilão, e da África, como Paquistão e Egito (VIEGAS JR. *et al.*, 2006).

Fonte: <<http://tropilab.com/yorkapesi.html>> Acesso em: 8 abr. 2008.

Quadro 1. Esquema da *Senna occidentalis* (*Cassia occidentalis*)

A *Senna occidentalis* (L.) Link (*S. occidentalis*) possui a sinonímia *Cassia occidentalis* (*C. occidentalis*) e pertence à subfamília *Caesalpinioideae* (**Quadro 2**). Esta espécie apresenta diversos nomes populares, dependendo do país e região onde é encontrada. No Brasil, podem ser citados os seguintes: *fedegoso*, *fedegoso verdadeiro*, *mata-pasto*, *café negro*, *mangerioba*, *pajamarioba*, *lava-pratos*, *folha-de-pajé*, *tararucu*, *mamangá* e outros (CORRÊA, 1926; SILVA, 1929; COIMBRA, 1958; TESKE e TRENTINI, 1994).

Fonte: <http://anthropoasis.free.fr/spip.php?article12&var_recherche=cassia%20occidentalis> Acesso em: 8 abr. 2008.

Quadro 2. Exsicata da *Senna occidentalis*

A *S. occidentalis* é uma planta ubíqua em regiões tropicais, sendo facilmente encontrada como um arbusto perene contaminante de plantações de cereais como milho, soja, sorgo, trigo e também em terrenos baldios e secos. Mostra-se mais prevalente em baixas altitudes, particularmente perto do mar. Ela vegeta em solos arenosos e de preferência em solos argilosos, sendo anual, bienal ou perene, com ciclo estival. Floresce de setembro a dezembro, frutifica até abril e propaga-se por sementes (LAL e GUPTA, 1973; GROTH, BOARETTO e SILVA, 1983; LACHMAN - WHITE, 1992; JAIN *et al.*, 1998).

Segundo Corrêa (1926), alguns autores inclinam-se a admitir que a planta originou-se do indigenato americano. É cosmopolita tropical e espontânea em todo o Brasil, sobretudo nos terrenos abertos, tapera, subúrbios de povoações e margens de estrada, além de cultivada na Índia para adubo verde e na Europa como ornamental.

A *S. occidentalis* foi caracterizada por Corrêa (1926) como um arbusto glabro, de caule herbáceo ou lenhoso na base, atingindo pouco mais de 1 m de altura, com ramos quase cilíndricos ou ligeiramente angulosos, folhas compostas alternas de 4 a 6 pares de folíolos curtos-peciolados, elítico-ovado-lanceolados, agudos, levemente oblíquos, com até 4 cm de comprimento e 25 mm de largura, verde-escuros nas duas páginas e com as margens um pouco pubescentes, raquis comprida, estipulada e com uma glândula na base. As flores são grandes, amarelas, com nervuras cor de laranja, dispostas em pequenos racimos corimbosos axilares, solitários nas folhas superiores ou aglomerados, formando panículas terminais (**Quadro 3**). Apresenta fruto vagem glabra com até 12 cm de comprimento e nove mm de largura, linear, oblongo, reto ou arqueado, comprimido lateralmente, depois convexo e quase cilíndrico (**Quadro 4**). O fruto contém 20 a 40 sementes ovóides e pequenas, duras, lisas, agudas numa extremidade e arredondadas na outra e de cor castanho escuro (**Quadro 5**).

Fonte: <http://toptropicals.com/cgi-bin/garden_catalog/cat.cgi> Acesso em: 8 abr. 2008.
<<http://plantatlas.usf.edu/images.asp?plantID=218#>> Acesso em: 8 abr. 2008.

Quadro 3. Folhas e flores de *Senna occidentalis*

Fonte: <<http://plantatlas.usf.edu/images.asp?plantID=218#>>
Acesso em: 8 abr. 2008.

Quadro 4. Fruto de *Senna occidentalis*

Fonte: <<http://plants.usda.gov/java/nameSearch?keywordquery=senna+occidentalis&mode=sciname&submit.x=18&submit.y=9>>
Acesso em: 8 abr. 2008.

Quadro 5. Sementes de *Senna occidentalis*

2.1.2. Aspectos étnicos da utilização da *Senna occidentalis*

As partes da *S. occidentalis* são largamente empregadas na medicina popular de regiões tropicais. Frequentemente elas são utilizadas como tônico, estomáquico, purgativo, diaforético, febrífugo, diurético e emenagogo. Sendo assim, a planta é aconselhada nos quadros de anemia, dispepsia atônica, ingurgitamento do fígado, biliose hematórica, febres dos tuberculosos, hidropisia flatulenta e desarranjos menstruais. Além disso, é útil no tratamento de doenças inflamatórias e infecciosas, como asma nervosa, reumatismo, enfermidades venéreas, erisipela, eczemas, problemas cutâneos e oculares (CORRÊA, 1926; COIMBRA, 1958).

A raiz da *S. occidentalis*, erradamente chamada de “córtex fedegoso”, é fortemente amarga e considerada um antídoto de vários venenos e um abortivo enérgico. É utilizada no Porto Rico, nos Estados Unidos e na Angola para tratar febre palustre, caquexia palustre e doenças hepáticas; e nas Antilhas, para combater as doenças cutâneas dos homens e dos animais. No oriente, o suco da raiz é aplicado topicamente sobre queimaduras (CORRÊA, 1926).

Coimbra (1958) descreve a utilização das raízes da *S. occidentalis* no preparo de formas farmacêuticas como infuso, decocto, extrato fluído, pó, tintura, elixir, vinho e xarope. A primeira edição da Farmacopéia Brasileira (SILVA, 1929) preconiza o emprego oficial do extrato fluído de raiz de fedegoso em mistura hidroalcoólica.

As sementes de *S. occidentalis*, quando torradas e moídas são usadas para preparar o café fedegoso ou café do Senegal, cuja infusão tem as mesmas virtudes medicinais atribuídas à raiz. As populações sertanejas brasileiras, especialmente no Ceará, usam-na como verdadeiro substituto do café, porém, não apresentando as propriedades estimulantes deste. Em 1925, devido ao elevado preço atingido pelo café no Piauí, organizou-se ali a torrefação industrial destas sementes para substituí-lo. Desde longos anos que vários países aproveitam-na para fraudar o legítimo café em pó (CORRÊA, 1926; TESKE e TRENTINI, 1994).

Na Nicarágua, a *S. occidentalis* é usada em quadros de dores e constipação em bebês. Na Guiana, tem uso em casos de hipertensão, diabetes e infecções na boca; suas raízes constituem um mastigatório contra afecções da garganta e um poderoso emético (CORRÊA, 1926; DENNIS, 1988; LACHMAN-WHITE, 1992).

Nos sistemas de medicina indiana, *Ayurveda* e *Unani*, a *S. occidentalis* é chamada de *kasamarda* e considerada uma importante droga para o tratamento de

doenças de pele e do fígado. Essa planta é um dos componentes de uma fórmula fitoterápica com indicações para desordens hepáticas (NADKARNI e NADKARNI, 1954; CHOPRA *et al.*, 1956; GAIND, BUDHIRAJA e KAUL, 1966; BARDHAN *et al.*, 1985, NAGARAJU *et al.*, 1990; JAIN *et al.*, 1998). Em época de escassez, é empregada na alimentação cotidiana das classes pobres do Ceilão e da Índia e suas sementes, quando macias, não apresentam gosto desagradável, sendo parecido com o do feijão. As vagens são atrativas e popularmente usadas por crianças em suas brincadeiras (CORRÊA, 1926; VASHISHTHA *et al.*, 2007).

Na África, a *S. occidentalis* é ministrada contra a febre amarela e como sucedânea do quinino nos casos em que este não apresenta resultados. Na Nigéria, a sopa das folhas é ingerida em casos de varíola e sarampo. Em Guiné Bissau, a planta costuma ser empregada como repelente de mosquitos (CORRÊA, 1926; OLIVER-BEVER, 1983; PALSSON e JAENSON, 1999; OGUNKULE e LADEJOBI, 2006).

Na medicina tradicional chinesa, as sementes de *Cassia tora* L. e *Cassia occidentalis* L., chamadas *jue ming zi*, são convencionalmente usadas para melhorar a acuidade visual e remover o “calor” do fígado (YEN, CHEN e DUH, 1998).

A família *Leguminosae* (*Fabaceae*) destaca-se no tratamento de sinais e sintomas relacionados a infecções fúngicas. Dados mostram que as espécies *Cassia alata*, *Cassia fistula* e *Cassia tora* apresentam propriedade antifúngica relevante. Na medicina popular brasileira, as folhas e sementes da *S. occidentalis* são utilizadas em casos de feridas e micoses como impingem e pano branco (ACHARYA e CHATTERJEE, 1975; DI STASI *et al.*, 1989; LORENZI e MATOS, 2002; PHONGPAICHIT *et al.*, 2004; FENNER *et al.*, 2006).

Estudos etnofarmacológicos revelam que a *S. occidentalis* tem grande importância para comunidades indígenas. Suas folhas são utilizadas pelos índios em suas pescarias, pois apresentam substâncias que quando diluídas na água são capazes de matar os peixes sem torná-los tóxicos. Além disso, o broto de *S. occidentalis* foi considerado bastante promissor quanto à propriedade nutricional desejável, dentre as espécies vegetais tropicais utilizadas pelos indígenas como alimento (TESKE e TRENTINI, 1994; AVRDC, 2003; GURGEL, 2004).

Na farmacologia guarani, a planta é denominada *taperiva* e utilizada como antiespasmódica e vermífuga. Na região Amazônica brasileira, principalmente em localidades do Pará e da Rondônia, as raízes são utilizadas para o tratamento de

malária. Na região do Xingó (Alagoas), o decocto das folhas e das raízes tem indicações para inflamação na garganta, hemorragia, gastrite e câncer, sendo esta planta classificada como uma espécie de alto valor de importância relativa para o uso medicinal nestas comunidades (BRANDÃO *et al.*, 1992; NOELLI, 1998; JARDIM, MENDONÇA e FERREIRA, 2001; ALMEIDA *et al.*, 2006).

Os índios *Xokleng* da Terra indígena Ibirama, Santa Catarina, empregam a casca da raiz para combater urina presa e males do fígado, havendo contra-indicação para gestantes, sob o risco de abortar (SENS, 2002). Segundo o trabalho de Rodrigues (2007) sobre as plantas consideradas de uso restrito nas culturas brasileiras de caboclos (Amazonas), quilombolas (Mato Grosso) e índios *Krahô* (Tocantins), o decocto de sementes de *S. occidentalis* foi também relatado pelo povo quilombola como sendo contra-indicado para gestantes.

2.1.3. Constituintes químicos da *Senna occidentalis*

A composição química de cada planta varia de acordo com o tempo de vida, temperatura e estação do ano (DWECK, 2003). Também podem interferir na determinação do perfil fitoquímico o local de origem, a época da colheita, as condições de armazenamento e os métodos de extração e avaliação.

A literatura relata o isolamento de mais de 350 metabólitos secundários do gênero *Cassia*. Os estudos evidenciaram a ocorrência de substâncias de várias classes, sendo as antraquinonas, os flavonóides e outros compostos fenólicos os constituintes mais freqüentes na maioria das espécies (VIEGAS JR. *et al.*, 2006).

As análises das sementes de *S. occidentalis* demonstraram a presença de antraquinonas e antronas tais como aloe-emodina, reína, fisiona-diantrona, islandicina e crisofanol-biantraquinona (SHAH e SHINDE, 1969; DUKE, 1992a; AL-WARHI, AL-HAZIMI e HUSSAIN, 2003). Segundo Rai e Shok (1983), o conteúdo de antraquinonas é maior nas sementes do que nas folhas e nas raízes. Também foram encontradas nas sementes as seguintes substâncias: cassiolina, morfolina, campesterol, sitosterol, taninos, crisarobina, helmintosporina, xantorina, proteínas, carboidratos (piranose, glucose, gomas e mucilagens), sais minerais (cálcio, cobre, ferro, magnésio, manganês, sódio, potássio e zinco), óleo essencial, gorduras e ácidos graxos (oleico, linoleico e linolênico) (GINDE *et al.*, 1970; KIM *et al.*, 1971; RIZVI *et al.*, 1971; DUKE, 1992a). De acordo com o trabalho feito por Katiyar e

Niranjan (1981) as sementes de *S. occidentalis* podem ser consideradas uma fonte eficiente de carboidratos e proteínas do ponto de vista nutricional, se suplementada com os aminoácidos essenciais faltantes. Foram demonstradas a ausência de ácido cisteico, glutamina, metionina, triptofano e valina, a presença de glucose, sucrose e rafinose e a ausência de frutose, maltose e arabinose. Segundo Gupta, Sharma e Soni (2005), o endosperma constitui uma rica fonte de galactomanana, componente que pode substituir as gomas convencionais em indústrias farmacêuticas, alimentícias, de papel e outras.

As análises das folhas da *S. occidentalis* demonstraram a presença de canferol, flavanona e glicosídeos flavonoídicos. Além disso, foram encontrados crisofanol, biantraquinona, alcalóides, taninos, flobataninos e saponinas (ANTON e DUQUÉNOIS, 1968; TIWARI e SINGH, 1977; HUSSAIN e DEENI, 1991; DUKE, 1992a; HATANO *et al.*, 1999; PURWAR *et al.*, 2003; OGUNKUNLE e LADEJOBI, 2006).

As análises das raízes da *S. occidentalis* demonstraram a presença de fitosteróis, fisciona, pinselina, metilxantona, saponinas, taninos, quercetina e diversos derivados de antraceno tais como antronas, crisofanol e emodina (LAL e GUPTA, 1973; WADER e KUDAV, 1987; KITANAKA *et al.*, 1989; DUKE, 1992a; EVANS, BANSO e SAMUEL, 2002).

Estudos mostraram ainda a presença de fisciona e emodina nas flores; glicosídeos flavonoídicos nos frutos; antraquinonas, cirsileneol e uma quantidade significativa de açúcar arabinose nos galhos da espécie (NIRANJAN e GUPTA, 1973; SINGH e SINGH, 1985; AL-WARHI, AL-HAZIMI e HUSSAIN, 2003).

Análises da planta toda revelaram também a presença de apigenina, jaceidina, funiculosina e polissacarídeos constituídos por unidades de manopirranose e galactopirranose (DUKE, 1992a). De acordo com Corrêa (1926), alguns pesquisadores afirmaram que a *S. occidentalis* possui algumas matérias corantes, tais como acrosina e leucoindigotina, esta última permitindo substituir a anileira, caso vantajoso economicamente.

Segundo Duke (1992b), a quercetina, a emodina, a aloe-emodina, a reína, o crisofanol e os taninos são substâncias que apresentam propriedade antimicrobiana.

Além disso, inúmeros trabalhos comprovam que em geral, os flavonóides e os compostos polifenólicos possuem a capacidade de interferir nas reações de propagação e formação de radicais livres. As pesquisas sugerem também que

alguns flavonóides apresentam atividade antitumoral considerável e podem ainda atuar como antivirais, anti-hemorrágicos, hormonais e antiinflamatórios (DUKE, 1992a; TRUEBA e SANCHEZ, 2001; ZUANAZZI e MONTANHA, 2004).

As quinonas estão incluídas entre os pigmentos naturais utilizados como corantes alimentares. Certas quinonas possuem o papel de defesa da planta contra insetos e outros patógenos, além de uma atividade alelopática, ou seja, inibição da germinação de outras espécies nas proximidades. A propriedade laxante é responsável pela utilização terapêutica da maioria dos vegetais que contêm quinonas, sendo as substâncias ativas, no caso, os derivados hidróxi-antracênicos. O crisofanol é uma antraquinona de reconhecida ação laxante e alguns estudos comprovaram também a sua ação contra o poliovírus (FALKENBERG, 2004).

Quanto à propriedade antimicrobiana, quinonas como reína, fisciona, aloemodina e crisofanol demonstraram ter ação antifúngica. A *Cassia tora*, espécie pertencente à mesma família de *S. occidentalis* tem como principal agente fungicida o ácido crisofânico-antrona. A crisarobina também é um antranol que se destaca por sua ação antifúngica (ACHARYA e CHATTERJEE, 1975; CESTARI *et al.*, 1991; AGARWAL *et al.*, 2000; SEMPLE *et al.*, 2001).

2.1.4. A atividade antimicrobiana da *Senna occidentalis*

A atividade antimicrobiana da *S. occidentalis* é relatada em muitos estudos científicos, os quais empregam diferentes partes da planta, solventes de extração e microrganismos. As variações de resultados observadas nesses trabalhos podem ser explicadas por fatores como o local de origem da planta e o método utilizado para a avaliação da atividade. Algumas informações foram selecionadas e a seguir reportadas, dando-se ênfase aos estudos envolvendo extratos preparados com água e/ou álcool e microrganismos de interesse no controle de qualidade de produtos farmacêuticos e cosméticos.

De acordo com o trabalho de Kumar, Bagchi e Darokar (1997), as sementes da *S. occidentalis* não apresentaram uma atividade antimicrobiana perceptível. No entanto, constam em trabalhos anteriores que os extratos alcoólicos das folhas e também das sementes inibiram o crescimento de bactérias como *E. coli* e *S. aureus*. Os componentes antraquinônicos extraídos de culturas calogênicas da planta apresentaram uma melhor atividade inibitória de bactérias Gram-negativas em

comparação com as Gram-positivas. O extrato alcoólico das folhas também demonstrou a atividade antifúngica, sendo capaz de inibir com relevância o crescimento micelial de *A. niger*, o que não foi observado para o extrato alcoólico das sementes. As frações de antraquinonas, senosídeos e flavonóides obtidas da planta apresentaram notável atividade contra este bolor (GAIND, BUDHIRAJA e KAUL, 1966; QUADRY e ZAFAR, 1978; PANDEY *et al.*, 1983; HUSSAIN e DEENI, 1991; JAIN *et al.*, 1998; SAMY e IGNACIMUTHU, 2000).

Segundo Oladumoye, Adetuyi e Akinyosoye (2007), um dos prováveis mecanismos da ação antibacteriana de extratos aquosos e alcoólicos das folhas de *S. occidentalis* se deve ao rompimento da célula microbiana, com conseqüente vazamento de íons sódio e potássio.

Ali *et al.* (1999) detectaram a presença de componentes fenólicos no extrato metanólico de *S. occidentalis*, o qual apresentou atividade contra o desenvolvimento dos seguintes microrganismos, em ordem de importância: *A. niger*, *C. albicans*, *E. coli* e *S. aureus*. No entanto, não foi observada uma atividade satisfatória contra *P. aeruginosa*. A *S. occidentalis* também não demonstrou relevante atividade antibacteriana específica para *Propionibacterium acnes* e *Staphylococcus epidermidis*, agentes etiológicos da acne vulgaris (CHOMNAWANG *et al.*, 2005).

A propriedade antifúngica da *S. occidentalis* está se mostrando ser muito promissora. Segundo Caceres *et al.* (1991 e 1993), a planta inibiu o crescimento de dermatófitos, fungos de elevada resistência que freqüentemente causam infecções de pele nos países em desenvolvimento. Exceto contra o *Microsporum canis*, o infuso das folhas apresentou ação inibitória de *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* (variantes *algodonosa* e *granular*) e *Trichophyton rubrum*. Já o extrato hidroalcoólico das raízes apresentou ação inibitória de *E. floccosum* e *T. rubrum*.

A atividade antimicrobiana da *S. occidentalis* é bastante atribuída as suas raízes. Estudos mostram que o decocto da raiz foi capaz de inibir a proliferação de *E. coli* e *Salmonella typhi*, importantes bactérias envolvidas nas boas práticas de produção de alimentos. A fração de emodina isolada do extrato hidroalcoólico das raízes demonstrou melhor atividade contra as bactérias Gram-positivas, *S. aureus* e *Bacillus subtilis*, em comparação com as bactérias Gram-negativas, *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae* (ANESINI e PEREZ, 1993; PEREZ e ANESINI, 1994; EVANS, BANSO e SAMUEL, 2002; CHUKWUJEKWU *et al.*, 2006).

2.1.5. Outras propriedades farmacológicas da *Senna occidentalis*

Além de possuir potencial antimicrobiano, como foi mencionado anteriormente, muitas outras atividades biológicas da *S. occidentalis* já foram comprovadas e algumas delas serão descritas a seguir.

Apesar de estudos *in vivo* mostrarem que a administração da *S. occidentalis* pode causar alterações hematológicas e histopatológicas, indicando algum nível de toxicidade no seu uso, diversos trabalhos revelam que as suas folhas apresentam um grande potencial farmacológico. Elas podem atuar como antiinflamatório, hipotensor, relaxante muscular, antiespasmódico, estimulante fraco do útero, vasoconstritor, inibidor da hemólise e inibidor da peroxidação lipídica. Além das folhas, alguns constituintes isolados da raiz e do caule apresentaram atividade antiinflamatória e antiplaquetária (FENG *et al.*, 1962; SADIQUE *et al.*, 1987; KUO *et al.*, 1996; MUYIBI, OLORODE e ONYEYILI, 2000).

Segundo Swanston-Flatt *et al.* (1989), a propriedade antidiabética da *S. occidentalis* não foi evidenciada. Já a sua atuação no fígado mostrou-se relevante em muitos trabalhos, havendo grande habilidade em proteger o fígado de toxinas, reparar prejuízos do órgão e normalizar enzimas e processos hepáticos (SETHI e SHARMA, 1978; SUBBARAO e GUPTA, 1976; SARAF *et al.*, 1994; JAFRI *et al.*, 1999; SHARMA *et al.*, 1999).

Por ser rica em componentes antraquinônicos, os quais possuem comprovada ação catártica, a *S. occidentalis* é uma planta que apresenta propriedade laxante. No entanto, foi determinado que o conteúdo de antraquinônicos e a potência catártica *in vivo* são menores que a *sene* [*Senna angustifolia* (Vahl) Batka; sin. *Cassia senna* L., *Senna acutifolia* (Delile) Batka, *Senna alexandrina* Garsault], espécie mais conhecida do gênero *Cassia* pelo seu uso como forte purgativo e utilizada como droga padrão (ELUJOBA *et al.*, 1989).

Em estudos com humanos, a *S. occidentalis* demonstrou atividade contra o vírus da hepatite B, porém, o extrato hidroalcoólico da planta não apresentou atividade antiviral relevante em protocolos *in vitro* utilizando *Poliovirus*, *Coxsackie*, *Semliki*, *Rubeola vírus* e *Vesiculovirus*, somente uma fraca atividade contra *Herpes simplex*. Além disso, não foram observados efeitos citotóxicos *in vitro* e antitumorais *in vivo* no uso dessa planta (SAMA *et al.*, 1976; JAIN *et al.*, 1998).

Mais tarde, foi evidenciada a capacidade da *S. occidentalis* em inibir carcinógeno *in vitro*, mutagenicidade *in vivo* e a propriedade imunoestimulante e protetora de imunossupressão induzida (SHARMA *et al.*, 1999 e 2000; BIN-HAFEEZ *et al.*, 2001). Em um estudo sobre a atividade tóxica de espécies vegetais do Amazonas às larvas do microcrustáceo *Artemia franciscana*, ensaio *in vitro* que possui uma correlação positiva entre a letalidade das larvas e a atividade antitumoral, mostrou que o extrato metanólico de folhas de *S. occidentalis* teve uma baixa atividade, enquanto o infuso das folhas apresentou atividade citotóxica relevante (ANDERSON *et al.*, 1991; QUIGNARD *et al.*, 2003). No *screening* da atividade tóxica de extratos vegetais para células tumorais humanas de mama (MCF-7), pulmão (H-460) e sistema nervoso central (SF-268) o extrato etanólico de *S. occidentalis* apresentou atividade seletiva para a linhagem de câncer de mama (CALDERÓN *et al.*, 2006).

Segundo Yen, Chen e Duh (1998), os extratos de sementes de *S. occidentalis* preparados em metanol demonstraram atividade antioxidante *in vitro*, a qual não foi observada utilizando extratos de sementes em n-hexano e acetato de etila. Neste estudo também foi verificada uma relevante atividade antioxidante do extrato metanólico de sementes da espécie *Cassia tora* e de sua fração emodina. Em uma aplicação cosmetológica, diversas espécies de *Cassia*, incluindo a *S. occidentalis*, foram empregadas por Seiyaku (1994) para a formulação de um creme com propriedades antioxidantes e clareadoras da pele. O guia AVRDC (2003) reporta que o broto de *S. occidentalis* é rico em vitamina C e beta-caroteno, podendo atuar como alimento funcional com propriedade antioxidante.

Apesar da planta fresca não ter apresentado resultado positivo como repelente de mosquitos, estudos mostraram que a *S. occidentalis* apresenta propriedade inseticida contra espécies de triatomíneos, insetos vetores da doença de Chagas. Além disso, o óleo fixo extraído das sementes diminuiu a aderência dos ovos e levou à mortalidade das larvas de *Callosobruchus maculatus*, um inseto encontrado com frequência em grãos estocados. Neste caso, esta toxicidade foi atribuída aos ácidos linoleico, oleico e esteárico das sementes (SCHMEDA-HIRSCHIMANN *et al.*, 1992; LIENARD *et al.*, 1993; PALSSON e JAENSON, 1999).

Em vista do uso popular da *S. occidentalis* no controle de doenças tropicais, especialmente em regiões da África e da Amazônia, estudos *in vitro* e *in vivo* comprovaram a atividade inibitória do *Plasmodium*, agente etiológico da malária. Tendo aplicação veterinária na África como anti-helmíntica, a *S. occidentalis* também

mostrou uma atividade ascaricida apreciável em avaliações *in vitro* (GASQUET *et al.*, 1993, TONA *et al.*, 2001 e 2004, PETER; DEOGRACIOUS, 2006).

2.1.6. Toxicidade da *Senna occidentalis*

A *S. occidentalis* é uma erva daninha que cresce com freqüência em áreas de pastagens e plantações. Muitos casos de intoxicação de animais de criação que a ingeriram acidentalmente foram reportados no leste do Texas, após a primeira morte súbita. A toxicidade dessa planta para animais é abordada em uma vasta literatura e suas sementes são incriminadas como a causa do aparecimento de doenças miodegenerativas nos mesmos, podendo ocasionar grandes prejuízos econômicos para a pecuária (PIERCE e O'HARA, 1967; ROGERS, GIBOSON e REICHMANN, 1979; BARTH *et al.*, 1994).

A semente da *S.occidentalis* possui tamanho e densidade similar à maioria dos grãos de cultivo, por isso, é grande o risco de contaminação de rações animais com a mesma. Diversos estudos visam desenvolver sistemas para controlar a contaminação das plantações, no entanto, os mesmos apresentam alto custo e não são completamente efetivos (SCHMITZ e DENTON, 1977; TEEN *et al.*, 1980; BOYETTE *et al.*, 1993; KEETON *et al.*, 1996).

Os efeitos da intoxicação com a *S.occidentalis* já foram observados em diversas espécies animais que ingeriram diferentes partes da planta e incluem lesões no fígado, alterações histopatológicas nos rins, degenerações nas musculaturas esquelética e cardíaca, perda de peso e morte (HENSON e DOLLAHITE, 1966; MERCER *et al.*, 1967; O'HARA, PIERCE e READ, 1969; COLVIN *et al.*, 1986; BARROS *et al.*, 1999). Segundo Hueza *et al.* (2007), a degeneração da musculatura esquelética é a lesão predominantemente encontrada, tanto na intoxicação natural quanto na experimental. Estudos realizados com frangos de corte demonstraram que a principal consequência nesses animais é a miopatia degenerativa do miocárdio e um grande impacto no sistema imune, principalmente na bursa de *Fabricius* (GRAZIANO *et al.*, 1983; GONZALES *et al.*, 1994; CALORE *et al.*, 1997; SILVA *et al.*, 2003).

Os quadros de intoxicação com a *S. occidentalis* já foram avaliados em gado e ovinos (DOLAHITE e HENSON, 1965); aves (SIMPSON, DAMRON e HARMS, 1971; FLORY *et al.*, 1992); cavalos (MARTIN *et al.*, 1981; IRIGOYEN *et al.*, 1991);

caprinos (SULIMAN e SHOMMEIN, 1986); suínos (MARTINS *et al.*, 1986); vitela (FAZ, GOICOCHEA e RUANO, 1998); coelhos (TASAKA *et al.*, 2000) e ratos (CALORE *et al.*, 2000).

A literatura mostra que as toxoalbuminas (MOUSSU, 1925), os alcalóides (KIM *et al.*, 1971) e as antraquinonas (KEAN *et al.*, 1971) são considerados os possíveis responsáveis pela toxicidade das sementes de *S. occidentalis*. O'Hara e Pierce (1974) propõem como mecanismo de ação da intoxicação o desacoplamento da fosforilação oxidativa. Mas segundo Hebert *et al.* (1983), a toxina ou mecanismo de ação que acarreta em miodegeneração ainda não foi definitivamente identificado e sugere tratar-se de uma molécula polar de natureza proteinácea. De acordo com Haraguchi *et al.* (1998), a diantrona é um dos principais constituintes tóxicos das sementes, sendo responsável pela promoção da miopatia mitocondrial.

As informações sobre a toxicidade da *S. occidentalis* para humanos são escassas. A ingestão de pequena quantidade das vagens pode não ter qualquer efeito prejudicial para um adulto, no entanto, pode ser fatal para uma criança. Uma significativa associação da síndrome da encefalopatia infantil com a intoxicação pela planta foi demonstrada. Esta doença tornou-se recorrente e com características anuais e sazonais na Índia, mas as investigações não detectaram um agente viral. Os achados histopatológicos apontaram para uma fitotoxina como possível causa, sendo isto relacionado à freqüentes incidentes com crianças indianas pouco supervisionadas que comeram certas sementes e frutas, havendo mortes de crianças que consumiram sementes mais tarde identificadas como *Senna occidentalis* (VASHISHTA *et al.*, 2007).

Um estudo revelou que não existe qualquer risco toxicológico aos consumidores da bebida preparada com as sementes de *S. occidentalis* para substituir o café, pois além da água não ser capaz de extrair a toxina, o fator tóxico das sementes é eliminado pelo procedimento usual de torrefação. Foi verificado que, com exceção dos ftatos, a torrefação provoca um decaimento significativo do nível de proteínas, carboidratos, fenóis totais e taninos (MEDOUA e MBOFUNG, 2006).

2.2. Cosméticos e agentes conservantes

Embora seja largamente difundida a idéia de que os produtos cosméticos constituem um privilégio apenas de sociedades ricas, alguns dados indicam que eles se originaram de uma herança de culturas indígenas e classes populares, no entanto, tais pesquisas de campo são muito negligenciadas nos estudos etnobiológicos e etnofarmacêuticos atuais (TAMMARO e XEPAPADAKIS, 1986; VIGUERAS e PORTILLO, 2001).

Nos sistemas de conhecimento popular, os cosméticos e os produtos medicinais destinados ao tratamento de doenças da pele são freqüentemente percebidos como dois pólos similares, sendo muito difícil desenvolver uma distinção clara entre eles (PIERONI *et al.*, 2004).

Enquanto as drogas são componentes usados para o tratamento e prevenção de doenças ou têm a intenção de afetar uma função fisiológica ou estrutural do corpo, os cosméticos são rotulados como substâncias que limpam ou realçam a aparência da pele sem benefícios terapêuticos. Desse modo, os cosmecêuticos representam híbridos entre drogas e produtos cosméticos, com a função de melhorar tanto a saúde quanto à beleza da pele, por meio de aplicação externa (ELSNER e MAIBACH, 2000; MILLIKAN, 2001).

Como no caso dos alimentos funcionais, os quais são consumidos devido aos seus benefícios específicos à saúde, os cosmecêuticos estão entre os fármacos para doenças de pele e os cosméticos. No entanto, eles são muito mais difíceis de serem definidos, porque o conceito de melhorar o valor estético do corpo pode mudar consideravelmente numa mesma cultura (ETKIN, 1996).

Segundo a definição da RDC n.º 211 de 14 de julho de 2005 (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2005) os produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes são preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano, pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e membranas mucosas da cavidade oral, com o objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência e/ou corrigir odores corporais e/ou protegê-los ou mantê-los em bom estado.

Em função da probabilidade de ocorrência de efeitos não desejados, esses produtos são classificados por esta resolução como Grau 1 ou Grau 2. Produtos

Grau 1 são aqueles que possuem propriedades básicas ou elementares e portanto, não requerem comprovação inicial de suas propriedades e informações detalhadas sobre o seu uso. Produtos Grau 2 são aqueles que possuem indicações específicas, exigindo comprovação de segurança e/ou eficácia, bem como informações detalhadas que incluem cuidados, modo de uso e restrições.

Diversos estudos científicos mostram que alguns componentes utilizados na formulação de cosméticos podem ocasionar reações de hipersensibilidade ao usuário. Segundo um estudo conduzido por Groot *et al.* (1988), os conservantes de cosméticos são os ingredientes responsáveis pela maior parte das alergias em pacientes sofrendo dermatites de contato, seguidos das fragrâncias e dos emulsificantes.

Conforme a RDC n.º 162 de 11 de setembro de 2001 (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2001) conservantes são substâncias que apresentam a finalidade primária de preservar os produtos de danos e/ou deteriorações causados por microrganismos durante sua fabricação e estocagem, bem como proteger o consumidor de contaminação inadvertida durante o uso.

O efeito antimicrobiano desejado pelo uso de um agente conservante é dirigido às células microbianas, ocorrendo um ou mais dos seguintes princípios gerais: desnaturação de enzimas e proteínas de membrana (álcoois); alteração química de enzimas e DNA (aldeídos); oxidação de enzimas e proteínas de membrana (ozônio, H₂O₂, compostos halogênicos); distúrbio da função da membrana (ácidos orgânicos) e destruição da membrana celular (álcoois e tensoativos) (IBARRA e JONHSON, 2008).

Devido ao fato de os agentes conservantes serem substâncias intrinsecamente tóxicas, a resolução mencionada acima também determina uma lista de substâncias e suas concentrações autorizadas para o uso na conservação de produtos.

Atualmente, o conceito de “natural” tornou-se decisivo para o desenvolvimento de novos agentes ativos que sejam mais aceitos pelas estruturas biológicas em relação aos componentes sintéticos. No caso dos agentes conservantes, substâncias com propriedade antimicrobiana podem ser conseguidas com base nos mecanismos químicos de defesa da natureza.

As fitoalexinas são substâncias produzidas pelas plantas para serem utilizadas na sua defesa contra bactérias e fungos. Numerosas fitoalexinas já foram identificadas, tais como, peróxido de hidrogênio, terpenóides, ácidos aromáticos,

ácidos graxos oxigenados, álcoois alifáticos e polióis; porém, muitos destes compostos não são adequados para o uso em cosméticos. Identificar agentes conservantes derivados da natureza é uma tarefa complexa, pois além da efetividade, eles devem ter um perfil toxicológico compatível e disponibilidade (IBARRA e JOHNSON, 2008).

2.3. Atividade antimicrobiana

2.3.1. Microrganismos padrões farmacêuticos

Os microrganismos patogênicos de interesse no controle de qualidade de produtos farmacêuticos, cosméticos e alimentícios variam de acordo com as matérias-primas empregadas, o tipo de produto, a via de administração e as boas práticas de fabricação adotadas. Conforme consta nos códigos de farmácia, os principais microrganismos utilizados no teste de eficácia de conservantes de cosméticos são: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Candida albicans* e *Aspergillus niger*. Assim, algumas características desses microrganismos serão descritas a seguir.

Os bacilos Gram-negativos pertencentes à família *Enterobacteriaceae* são as bactérias isoladas com mais frequência em amostras biológicas. Distribuídos amplamente na natureza, esses microrganismos são encontrados no solo, na água, nas plantas e no trato intestinal de seres humanos e animais. A *E. coli* é um bacilo Gram-negativo de origem entérica que pode originar-se de contaminação aquosa, estando transitoriamente associado à flora residente, dependendo dos hábitos de higiene. Clinicamente, este é um dos microrganismos mais comuns em septicemias e em choque induzido por endotoxinas. Geralmente, as infecções com esta bactéria acometem feridas, o trato urinário e os pulmões, podendo ocasionar quadros de pneumonia em pacientes imunossuprimidos e meningite em neonatos. Certas cepas podem causar enterite ou gastroenterite por mecanismos diferentes e síndromes distintas (KONEMAN *et al.*, 2001; PINTO, KANEKO e OHARA, 2003).

As bactérias Gram-positivas, especialmente os cocos, também são microrganismos isolados com frequência de amostras biológicas. Essas bactérias são amplamente distribuídas na natureza e como habitantes comensais da pele, mucosas e outros sítios corpóreos dos seres humanos e animais. O *S. aureus* é um

coco Gram-positivo pertencente à família *Micrococcaceae* e considerado um importante indicador de manipulação inadequada. Este microorganismo pode ser encontrado nas narinas anteriores de 20 a 40% nos adultos. Outros sítios de colonização incluem as pregas cutâneas, o períneo, as axilas e a vagina. Embora o *S. aureus* faça parte da microbiota humana normal, estando em condições apropriadas ele pode produzir infecções oportunistas. Os processos infecciosos variam desde infecções cutâneas crônicas relativamente benignas até infecções sistêmicas parcialmente fatais. As toxinas estafilocócicas são responsáveis pela necrose epidérmica tóxica e pela síndrome do choque tóxico. Algumas cepas podem produzir infecções alimentares, devido à elaboração de exotoxinas durante sua proliferação em alimentos (KONEMAN *et al.*, 2001).

Os bacilos Gram-negativos aeróbios e não formadores de esporos pertencentes ao gênero *Pseudomonas* são os principais microrganismos encontrados em água purificada contaminada. Estes microrganismos apresentam necessidade nutricional reduzida, o que possibilita a multiplicação neste tipo de água. A *P. aeruginosa* é o pseudomonídeo mais isolado de amostras clínicas. As infecções com esta bactéria geralmente são observadas em sítios onde existe tendência ao acúmulo de umidade, como no trato urinário, no trato respiratório inferior e em quadros de úlcera córnea. Ela é também freqüentemente associada a infecções provocadas por produtos tópicos contaminados, como pomadas e colírios, sendo responsabilizada por casos de infecção ocular grave e até perda de visão (KALLINGS *et al.*, 1966; WOLVEN e LEVEINSTEIN, 1969; COOKSON e MORGAN, 1972).

A *Burkholderia cepacia* é um bacilo Gram-negativo não fermentador da lactose, anteriormente incluído no gênero *Pseudomonas*. O novo gênero, *Burkholderia*, foi definido em 1992, devido às características genéticas particulares desses microrganismos. Estudos taxonômicos da espécie *B. cepacia* determinaram que ela possui ao menos cinco subespécies, sendo assim denominada de complexo *B. cepacia*. Trata-se de um fitopatógeno associado à putrefação dos bulbos de cebola e isolado com freqüência de fontes d'água e superfícies úmidas. Pode causar infecções oportunistas ao homem, em particular naqueles pacientes com doença granulomatosa crônica e fibrocística, possuindo grande capacidade de se espalhar entre os pacientes e levar a bacteremia fatal. Alguns trabalhos mostram que essa bactéria já foi isolada de produtos cosméticos, soluções anti-sépticas, detergentes e líquidos endovenosos, provavelmente devido à contaminação da água de produção

industrial (SPELLER, STEPHENS e VIAN, 1971; BURNS e SAIMAN, 1991; KONEMAN *et al.*, 2001; SPEERT, 2001).

A *C. albicans* é a levedura isolada com maior frequência de amostras biológicas, sendo encontrada como um agente colonizador habitual da pele e mucosas humanas e animais. Em média, 25 a 30% dos indivíduos são portadores de *C. albicans* na cavidade oral, 50% no trato gastrintestinal e 30% das mulheres têm colonização vaginal em algum momento, o qual é particularmente prevalente durante a gravidez. Este é um microrganismo oportunista, podendo causar infecções na pele, boca, estômago e vagina. A produção de fosfolipase é o fator que provoca dano à célula epitelial. Além disso, as espécies de *Candida* são responsáveis por grande parte das infecções nosocomiais, onde a *C. albicans* é a mais frequente, estando presente em 50 a 70% de todas as infecções invasivas. As infecções hospitalares com este agente se devem a diversos fatores, como o tratamento com antimicrobianos de amplo espectro e conseqüente desenvolvimento de resistência pelo fungo e o uso de procedimentos que apresentam risco de contaminação, como nutrição parenteral, cateteres intravenosos, entubação endotraqueal e outros. A maior frequência ocorre em pacientes com predisposição de base, como em neonatos e em casos de patologia oncológica, quimioterapia, terapias imunossupressoras e pacientes submetidos a cirurgias de grande porte (CHAKRABARTI, NAVAK e TALWAR, 1991; KONEMAN *et al.*, 2001; ZARDO e MEZZARI, 2004).

Os aspergilos constituem um grupo de fungos filamentosos hialinos de crescimento rápido e que usualmente provocam infecções oportunistas em humanos. Estes fungos produzem conídios, estruturas amplamente distribuídas no solo, vegetais em decomposição e em uma variedade de matérias orgânicas. *A. niger* é um bolor comumente encontrado no meio ambiente e também um dos fungos mais isolados em pacientes hospitalizados. As doenças que podem ser causadas por este microrganismo são: queratite micótica, otomicose e infecções sinusais e respiratórias por inalação de pó contaminado com conídios (KONEMAN *et al.*, 2001).

2.3.2. Técnicas *in vitro* para a avaliação da atividade antimicrobiana

Não existe um método padronizado para expressar os resultados de testes antimicrobianos de produtos naturais. As variações referentes à determinação da concentração mínima inibitória (MIC) de extratos de plantas podem ser atribuídas a inúmeros fatores, tais como a técnica empregada, a cepa do microrganismo, a origem da planta, a época da coleta, a utilização da planta fresca ou seca, a concentração testada, etc (OSTROSKY *et al.*, 2007).

O teste de difusão em ágar, também chamado de difusão em placas, é um método aceito pelo FDA (*Food and Drug Administration*) e estabelecido como padrão pelo NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*). Trata-se de um método físico no qual o microrganismo é desafiado contra uma substância biologicamente ativa, empregando-se um meio de cultura sólido. Este método relaciona o tamanho da zona de inibição de crescimento do microrganismo com a concentração da substância ensaiada, em comparação com um controle positivo. Os microrganismos podem então ser classificados como sensíveis, moderadamente sensíveis e resistentes. A necessidade do emprego de microrganismos aeróbios ou aeróbios facultativos de crescimento rápido é uma limitação do teste de difusão (BARRY e THORNSBERRY, 1991; THORNSBERRY, 1991; COLLINS, 1995; MADIGAN, MARTINKO e PARKER, 2000; PINTO, KANEKO e OHARA, 2003).

Segundo Pinto, Kaneko e Ohara (2003), as técnicas utilizadas para aplicação das amostras no meio de cultura sólido podem ser: disco de papel, perfuração no ágar ou cilindros de aço inoxidável ou vidro.

Nos estudos sobre a avaliação da atividade antimicrobiana de produtos naturais, o uso do disco de papel se mostrou ser a técnica mais comum, sendo descrita em diversos trabalhos (SHRIMALI *et al.*, 2001; TSHINBANGU *et al.*, 2002; BARBOUR *et al.*, 2004; JEEVAN RAM *et al.*, 2004; VORAVUTHIKUNCHAI *et al.*, 2004; SHUNYING *et al.*, 2005; TADEG *et al.*, 2005; SINGH *et al.*, 2005).

No entanto, conforme a literatura indica, o emprego das demais técnicas também se aplica à avaliação de produtos naturais (RAHUA *et al.*, 2000; OKEKE *et al.*, 2001; MOODY, ADEBIYI e ADENIYI, 2004; COELHO DE SOUZA *et al.*, 2004; OKOLI e IROEGBU, 2004).

O método da diluição em meio líquido também pode ser utilizado para a avaliação de atividade antimicrobiana. Este método considera a relação entre a

proporção do crescimento microbiano e a concentração da substância ensaiada, por meio da medida da densidade óptica resultante da turbidez do caldo. Ele fornece resultados quantitativos e não é influenciado pela velocidade de crescimento dos microrganismos (THORNSBERRY, 1991; COLLINS, 1995; PINTO, KANEKO e OHARA, 2003).

A técnica da macrodiluição é considerada bastante laboriosa porque requer grande quantidade de meio líquido, tubos de ensaio, amostra, espaço e tempo. Além disso, gera uma grande quantidade de resíduos (SAHM e WASHINGTON, 1991; ZGODA e PORTER, 2001).

A avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais empregando uma técnica de microdiluição foi desenvolvida inicialmente por Eloff (1998). Em comparação com a macrodiluição, esta técnica apresenta uma série de vantagens, como o uso de pequena quantidade de meio de cultura e amostra, sensibilidade, reprodutibilidade e robustez. No entanto, esta técnica tem como inconveniente a adesão de células microbianas na base do poço da microplaca, além das desvantagens inerentes ao método de diluição, ou seja, interferência da coloração da amostra e ocorrência de precipitação ou complexação de substâncias da amostra quando em contato com o meio de cultura. Assim, algumas adaptações da técnica da microdiluição e o emprego de controles estão sendo utilizados com êxito por alguns pesquisadores (KHAN e KATIYAR, 2000; SIMIÉ *et al.*, 2004; SUFFREDINI *et al.*, 2004; RAHMAN *et al.*, 2005; DUPONT *et al.*, 2006).

2.3.3. Condições experimentais para a avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro*

Os métodos de difusão em placas e de diluição em meios líquidos podem estar sujeitos à influência de diversos fatores, havendo a necessidade de uma padronização rigorosa das condições experimentais e de execução do teste (MADIGAN, MARTINKO e PARKER, 2000).

Primeiramente, os meios destinados para a cultura dos microrganismos devem proporcionar um crescimento adequado e não conter substâncias antagônicas à atividade antimicrobiana em estudo (PINTO, KANEKO e OHARA, 2003).

O meio *Müller Hinton* (MH) mostrou ser o mais utilizado na maioria dos estudos sobre susceptibilidade de bactérias a produtos naturais (JETTY e IYENGAR, 2000;

CHATTOPADHYAY *et al.*, 2001 e 2002; FERESIN *et al.*, 2001; SCAZZOCCHIO *et al.*, 2001; CARVALHO *et al.*, 2002; CORTEZ *et al.*, 2002; HAMILL *et al.*, 2003; CHANDRASEKARAM e VENKATESALU, 2004).

Na avaliação da atividade de extratos naturais contra fungos, os meios de cultura comumente empregados são: ágar *Sabouraud* dextrose (SDA) e caldo *Sabouraud* dextrose (SDB) (MEHMOOD *et al.*, 1999; IROBI e ADEDAYO, 1999; RAJANI *et al.*, 2002); ágar batata dextrose (PDA) (KARAMAN *et al.*, 2003); *Bacto Yeast Morphology Agar* (RABANAL *et al.*, 2002) e caldo de levedura (ZGODA e PORTER, 2001).

O pH do meio é um importante parâmetro do sistema, devendo ser compatível com o crescimento microbiano e com a atividade e a estabilidade das amostras. Além disso, as condições de disponibilidade de gás também podem influenciar na multiplicação, conforme o metabolismo do microrganismo desafiante, ou seja, aeróbico, anaeróbico ou facultativo (LI-CHANG, YUE-WEN e CHENG-CHUN, 2005; OSTROSKY, 2007).

A preparação do inóculo deve ser feita a partir de quatro ou cinco colônias da cultura do microrganismo, evitando-se a seleção de uma cepa variante atípica. Após o crescimento em caldo nutriente, este deve ser diluído de acordo com a escala *McFarland*. Alternativamente, o inóculo pode ser ajustado fotometricamente ou por diluição padronizada, se a densidade das culturas for razoavelmente constante. A padronização da quantidade do inóculo deverá ser estabelecida para cada método desenvolvido. No teste de susceptibilidade do *Staphylococcus* à meticilina, por exemplo, esse padrão deve ser de 10^6 UFC no método de difusão em placas e de 10^5 UFC no início do período de incubação de meios líquidos (SAHM e WASHINGTON II, 1991; COLLINS, 1995; SUTTON, 2006).

Um quimioterápico padrão deve ser empregado como controle positivo do teste e o solvente utilizado para a dissolução da amostra não poderá inibir o crescimento do microrganismo, devendo ser considerado como o controle negativo do teste (ANDREWS, 2001; MACGOWAN e WISE, 2001).

Por fim, a temperatura de incubação deve ser feita a 35-37 °C para o crescimento de bactérias e a 25-27 °C para o crescimento dos fungos. No método de difusão, as placas devem ser incubadas em estufa com temperatura homogênea. Para a técnica da macrodiluição, as condições de crescimento devem ser semelhantes em todos os tubos de ensaio, devendo-se empregar temperatura e agitação constantes

(COLLINS, 1995; KARAMAN *et al.*, 2003; SPRINGFIELD *et al.*, 2003; CHANDRASEKARAN e VENKATESALU, 2004).

2.4. Atividade tóxica e métodos *in vitro* para a sua avaliação

Nos últimos anos, os protestos contra o uso de animais de laboratório em estudos toxicológicos foram mais significativos e intensos. As pressões, tanto humanas quanto econômicas para a substituição dos testes *in vivo* levaram ao desenvolvimento acentuado de novas metodologias, como o emprego de culturas de células e de tecidos, ensaios químicos e físicos, tecidos simulados, fluídos corpóreos, organismos inferiores, simulações em computador e modelos mecânicos e matemáticos (FRESHNEY, 2000; PINTO, KANEKO e OHARA, 2003).

A realização de ensaios alternativos na avaliação da segurança de produtos farmacêuticos e cosméticos é muito mais abrangente do que a simples substituição do uso de animais. Ela inclui também como importantes questões a redução da quantidade de animais nos protocolos experimentais e o refinamento das técnicas, a fim de minimizar o sofrimento. Estes princípios estão baseados no conceito dos 3R's - *replacement, reduction and refine* - definido por William Russell e Rex Burch, em 1959 (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2003).

Os métodos *in vitro* oferecem uma série de vantagens. Eles podem ser utilizados em estágios iniciais do desenvolvimento de fármacos, requerem uma pequena quantidade de amostra e reduzem drasticamente o uso de animais de laboratório. Para muitos casos, o emprego de culturas primárias de células humanas de diferentes órgãos-alvo pode prover uma informação direta sobre os efeitos potenciais, o que pode ser relevante cientificamente (DOYLE e GRIFFITHS, 2000).

O monitoramento dos efeitos sistêmicos e fisiológicos *in vitro* é difícil, visto que a toxicidade é um evento muito complexo. Assim, a maioria desses testes determina os efeitos em nível celular. As definições de citotoxicidade variam dependendo da natureza do estudo e do efeito resultante, podendo ser uma alteração no metabolismo celular ou a morte da célula (FRESHNEY, 2000).

Os experimentos sobre a citotoxicidade são delineados para determinar a máxima concentração não tóxica (MNTC) de um fármaco, isto é, a concentração mais elevada que é compatível com a sobrevivência celular. Os dados de toxicidade

são expressos como IC₁₀ e IC₅₀, ou seja, a concentração que causa 10 e 50% de morte celular (DOYLE e GRIFFITHS, 2000).

A qualidade e a especificidade dos dados gerados pelos modelos *in vitro* dependem de diversos fatores, como o uso de um sistema biológico que reproduza o comportamento metabólico do órgão envolvido com o efeito do xenobiótico; a escolha de parâmetros apropriados para avaliar o efeito tóxico *in vitro* e o correto delineamento experimental que resulte em dados que possam predizer os efeitos potenciais *in vivo* (CASTELL e GÓMEZ-LECHÓN, 1992; CASTELL *et al.*, 1997).

Segundo Majmudar e Smith (1998), populações celulares relativamente bem definidas de queratinócitos, melanócitos, células de *Langerhans*, fibroblastos e sebócitos podem ser isoladas da pele humana e utilizadas para testes de atividade biológica de vários compostos medicamentosos e cosméticos. Os fibroblastos são as células mais populosas da derme e largamente utilizadas em cultura celular, devido à alta capacidade de crescimento e vigor, quando comparadas com outras linhagens. Eles possuem formato alongado e terminações pontiagudas, tendo como principal função a síntese das proteínas da matriz celular (colágeno, fibronectina, elastina e proteoglicanas), bem como das enzimas de degradação dessas proteínas (colagenase, elastase e outras metaloproteinases).

Os parâmetros mais utilizados para detectar a citotoxicidade consistem na análise da célula quanto à morfologia, viabilidade, adesão, proliferação, prejuízo na membrana, absorção ou incorporação no material genético e efeitos metabólicos (DOYLE e GRIFFITHS, 2000).

Os testes de viabilidade celular fornecem informações quanto a respostas imediatas ou curtas, tais como alterações na permeabilidade da membrana ou perturbações em um caminho metabólico específico e medem a proporção de células viáveis após o procedimento traumático. A ruptura da integridade da membrana é determinada pela entrada de um corante ao qual a célula é geralmente impermeável, como o *trypan blue*, ou a liberação de um corante normalmente adquirido e retido por células viáveis, como o *neutral red* (FRESHNEY, 2000).

A alteração na permeabilidade da membrana celular também pode levar a um extravasamento de enzimas citoplasmáticas ao meio de cultura, constituindo um parâmetro de primeira escolha para uma avaliação rápida e sensível da citotoxicidade. Os testes empregando sais tetrazólio, como MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio), por exemplo, baseiam-se

na conversão destes sais pela enzima mitocondrial succinato-desidrogenase - com o requerimento de NADH celular - em produtos coloridos. Esses testes são os mais usados para a avaliação da toxicidade em células. Assim, o princípio da técnica empregando o sal MTS é a biorredução deste sal pelas enzimas desidrogenases das células ainda ativas, em um produto denominado formazana, que é solúvel no meio de cultura e absorve fortemente a 490 nm. Portanto, a quantidade de formazana detectada é diretamente proporcional ao número de células vivas em cultura (DOYLE e GRIFFITHS, 2000; PROMEGA CORPORATION, 2001).

Embora os testes de toxicidade *in vitro* ainda não possam substituir completamente os testes *in vivo*, eles podem fornecer informações úteis quanto aos aspectos que influenciam o crescimento ou a sobrevivência celular. Além disso, estudos mostram a existência de uma correlação entre a toxicidade aguda *in vitro* e *in vivo*, a qual possibilita estimar as doses iniciais para os testes *in vivo*, diminuindo consideravelmente o número de animais (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2001; LOPES, 2003).

2.5. Atividade antioxidante

2.5.1. Radicais livres e substâncias antioxidantes

Toda espécie química que apresenta em sua estrutura um ou mais elétrons desemparelhados possui alta reatividade e é definida como radical livre. Na natureza, o oxigênio no estado fundamental (O_2) e o óxido de nitrogênio (NO) são importantes substâncias capazes de gerar radicais livres. O superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($OH^{\bullet}$) são espécies reativas do oxigênio (ROS) que podem ser originadas por absorção de energia, transferência de elétrons ou redução unieletrônica do oxigênio à água. O peróxido de hidrogênio apresenta uma alta capacidade de atravessar as membranas celulares. Quando este composto recebe um elétron em sua estrutura, origina o radical hidroxila, que é uma das espécies radiculares mais reativas que existem. Para se estabilizarem, os radicais livres devem doar ou receber elétrons de outra molécula, tornando esta última uma espécie que também possui as características de um radical livre (CHEESEMAN e SLATTER, 1996; ROVER JUNIOR *et al.*, 2001).

Fisiologicamente, as espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) possuem um importante papel como mediadores da manutenção do equilíbrio redox e da homeostase, podendo atuar como moléculas transdutoras de sinais e moduladoras do tônus vascular, da pressão de oxigênio e da produção de eritropoetina. A formação de radicais livres é inevitável durante o processo de respiração dos organismos aeróbicos. Sob condições normais, essas moléculas são efetivamente eliminadas por sistemas enzimáticos (superóxido dismutase, peroxidases, glutathione e metaloproteínas) e fatores não enzimáticos (albumina, ácido úrico, bilirrubina e certos grupos de vitaminas). Quando o equilíbrio pró-oxidantes/antioxidantes é deslocado no sentido dos pró-oxidantes, danos oxidativos podem ocorrer. Por serem muito instáveis, os radicais livres reagem rapidamente com outros grupos de substâncias do organismo, podendo prejudicar células e tecidos. Os lipídeos da membrana celular, as proteínas e o material genético são as biomoléculas mais atingidas (SOMOGYI *et al.*, 2007).

Os radicais livres também podem ser produzidos por fontes exógenas como fumaça, radiações ionizantes, solventes orgânicos e pesticidas. Além de fazerem parte do processo de envelhecimento do corpo, uma série de doenças, como aterosclerose, diabetes, artrite, AIDS, câncer, entre outras, podem estar relacionadas aos danos causados pelo excesso de radicais livres no organismo. Estudos mostram que os mecanismos endógenos de defesa podem ser auxiliados favoravelmente com a introdução de antioxidantes na dieta (BRENNAN e PAGLIARINI, 2001; YILDIRIM, MAVI, KARA, 2001).

Já os danos oxidativos a matérias-primas industriais são relevantes para a manutenção da qualidade dos produtos, principalmente os alimentos, medicamentos e cosméticos. Nestes casos, a reação de oxidação de ácidos graxos é a mais importante, visto que as gorduras são insumos largamente empregados na formulação desses produtos. Esta reação pode ocorrer através de mecanismos via enzimática ou não enzimática, levando a deterioração dos lipídeos. A reação direta de uma molécula de lipídeo com uma molécula de oxigênio resulta na auto-oxidação, que pode ser dividida em três fases: iniciação, propagação e terminal. Neste sentido, substâncias com ação antioxidante são frequentemente empregadas como coadjuvantes de formulações, dentre elas, o tocoferol (vitamina E), o ácido ascórbico (vitamina C), os carotenóides, o butil-hidróxi-tolueno (BHT), o butil-hidroxianisol (BHA), as butilhidroquinonas terciárias (T-BHQ) e o ácido cítrico (BOBBIO e

BOBBIO, 1992; FENNEMA, 1993; RICE-EVANS, MILLER e PAGANGA, 1996; ADEGOKE, 1998; BIRCH *et al.*, 2001).

Antioxidantes são compostos naturais ou sintéticos que podem retardar ou inibir a oxidação, evitando o início ou a propagação das reações em cadeia. O interesse pelos antioxidantes naturais teve início na década de 80, diante do potencial carcinogênico e da comprovação dos efeitos maléficos causados por doses elevadas das substâncias sintéticas. Evidências científicas mostram que a propriedade antioxidante de especiarias e vegetais se deve principalmente aos fenólicos, pois eles possuem a capacidade de óxido-redução, quelação do oxigênio triplete e singlete ou decomposição dos peróxidos (ANTUNES e CANHOS, 1984; SIMÃO, 1985; POKORNÝ, 1991; DURÁN e PADILLA, 1993; BRENNA e PAGLIARINI, 2001; ZHENG e WANG, 2001; DOMÍNGUEZ *et al.*, 2005).

Os flavonóides são substâncias polifenólicas de origem natural que determinam os perfis sensoriais de frutas e vegetais. Mais de 6000 estruturas químicas diferentes dessas substâncias já foram identificadas. A classe das antocianinas é formada por compostos de coloração que varia do vermelho ao azul e ela inclui os pigmentos denominados antocianidinas. A classe das antoxantonas apresenta compostos de tonalidades amarelas e ela inclui os seguintes pigmentos: flavonas, flavonóis, flavononas, chalconas, auronas, isoflavonas, leucoantocianinas, proantocianinas e catequinas. Diversas pesquisas associam a capacidade desta classe fitoquímica em proteger o organismo contra doenças do envelhecimento. Sob o ponto de vista nutricional, os flavonóides são reconhecidamente agentes antioxidantes que podem ser capazes de inibir a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e de reduzir significativamente as tendências a doenças trombóticas (RAUHA *et al.* 2000; BURDA e OLESZEK, 2001; BURNS, *et al.* 2001; KOO e SUHAILA, 2001; SLUIS *et al.*, 2001; VINSON *et al.*, 2001; WANG e ZHENG, 2001; AHERNE e O'BRIEN, 2002; CORDENUNSI *et al.*, 2002; SELLAPAN, AKOH e KREWER, 2002).

Além dos compostos fenólicos, diversos extratos e moléculas extraídas da natureza já foram avaliados quanto à capacidade antioxidante. Gholizadeh *et al.* (2004) mostraram pela primeira vez uma forte propriedade antioxidante de uma proteína antiviral de origem vegetal. O estudo de Ekanayake, Lee e Lee (2004), pode ser um exemplo sobre a investigação dessa propriedade em fontes animais, visto que ele mostra a capacidade antioxidante de substâncias derivadas de espécies marinhas.

2.5.2. Técnicas *in vitro* para a avaliação da atividade antioxidante

Os sistemas *in vitro* comumente utilizados para a avaliação da atividade antioxidante apresentam como vantagens o custo, a rapidez e a facilidade de execução, quando comparados com os sistemas *in vivo*. No entanto, para realizar um estudo criterioso sobre o potencial antioxidante de uma determinada substância sem o uso de animais, existe a necessidade de execução de variados tipos de protocolos *in vitro*. Nestes protocolos, o radical peroxílico é um composto freqüentemente empregado, por ser um componente chave da auto-oxidação e facilmente produzido pela decomposição de azo-compostos (MACDONALD-WICKS, WOOD e GARG, 2006; MELLO e KUBOTA, 2007).

O radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazila) também é um dos mais utilizados em testes *in vitro* que visam uma avaliação preliminar do potencial antioxidante. Conforme mostrado na reação a seguir, o radical DPPH (DPPH^{*}) pode ser estabilizado por uma substância (A), que é doadora de hidrogênio (AH):

Como resultado, a alteração da cor violeta característica do radical livre para a cor amarela do radical estável resulta na diminuição da medida da absorbância em comprimento de onda de 517 nm. Portanto, o consumo de DPPH representa um índice para estimar a capacidade antioxidante de uma substância capaz de capturar os radicais livres presentes no meio (SÁNCHEZ-MORENO *et al.*, 1998; ESPÍN *et al.*, 2000; MENSOR *et al.*, 2001).

Além deste teste, muitas outras técnicas *in vitro* podem ser utilizadas para a avaliação da atividade antioxidante, combinando inúmeros sistemas e métodos de detecção. Os **Quadros 6 e 7** apresentam alguns trabalhos que podem exemplificar esta vasta literatura:

Sistema	Referência
ácido hipocloroso, peróxido de hidrogênio, superóxido, óxido nítrico, hidroxila	Velloso (2007)
DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazila)	Koleva <i>et al.</i> (2002); Taskova <i>et al.</i> (2003); Ekanayake, Lee e Lee (2004); Silva <i>et al.</i> (2005); Duarte-Almeida <i>et al.</i> (2006); Sharififar <i>et al.</i> (2007)
beta-caroteno/ácido linoleico	Koleva <i>et al.</i> (2002); Warnant <i>et al.</i> (2004); Reddy, Urooj e Kumar (2005); Duarte-Almeida <i>et al.</i> (2006)
difusão do beta-caroteno em ágar	Dorman <i>et al.</i> (2000)
ABTS [2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)]	Yu <i>et al.</i> (2002)
TBA (ácido tiobarbitúrico)	Dorman <i>et al.</i> (2000)
ORAC (<i>Oxygen Radical Absorption Capacity</i>)	Macdonald-Wicks, Wood e Garg (2006)
AIOR (<i>Antioxidant Inhibition of Oxygen Radicals</i>)	Ozyurt, Demirata e Apak (2007)
TRAP (<i>Total Radical Trapping Antioxidant Parameter</i>)	Somogyi <i>et al.</i> (2007)
FRAP (<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>)	Ou <i>et al.</i> (2002); Gholizadeh <i>et al.</i> (2004)
células eucarióticas submetidas a stress oxidativo	Silva <i>et al.</i> (2005)

Quadro 6. Sistemas *in vitro* que podem ser utilizados para a avaliação da atividade antioxidante

Método de detecção	Referência
colorimetria e espectrofotometria	Koleva <i>et al.</i> (2002); Taskova <i>et al.</i> (2003); Ekanayake, Lee e Lee (2004); Warnant <i>et al.</i> (2004); Reddy, Urooj e Kumar, (2005); Silva <i>et al.</i> (2005); Duarte-Almeida <i>et al.</i> (2006)
quimioluminescência	Osamu <i>et al.</i> (1997); Georgetti <i>et al.</i> (2003)
fluorescência	Macdonald-Wicks, Wood e Garg (2006)
amperometria	Milardovic, Ivekovic e Grabaric (2006)
biosensores	Mello e Kubota (2007)
eletroforese	Grippa <i>et al.</i> (2000)
cromatografia líquida de alta eficiência	Grippa <i>et al.</i> (2000); Chandrasekar <i>et al.</i> (2006)
cromatografia gasosa	Koleva <i>et al.</i> (2002)
ressonância elétron spin	Scheller <i>et al.</i> (1990); Yu <i>et al.</i> (2002)

Quadro 7. Métodos de detecção que podem ser utilizados nos ensaios de avaliação da atividade antioxidante

3. OBJETIVOS

O trabalho teve como objetivo a avaliação da atividade antimicrobiana e da citotoxicidade de extratos de sementes e de partes aéreas da *Senna occidentalis* L. (Link), visando sua utilização em preparações tópicas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

A espécie vegetal *Senna occidentalis* L. (Link) foi procedente da cultura experimental do Instituto Biológico, São Paulo/SP e utilizada como objeto de estudo deste trabalho. A espécie foi autenticada pela Dr.^a Inês Cordeiro, com o depósito da exsicata testemunha ou *voucher* SP-363817 no Herbário Maria Eneida Fidalgo, do Instituto de Botânica, São Paulo/SP.

4.2. Métodos

4.2.1. Obtenção dos extratos de *Senna occidentalis*

4.2.1.1. Extração hidroalcoólica de partes aéreas e de sementes de *Senna occidentalis*

O extrato hidroalcoólico das partes aéreas (folhas, caules, flores e frutos jovens) e o extrato hidroalcoólico das sementes de *S. occidentalis* foram obtidos em condições semelhantes e de acordo com as indicações da segunda edição da Farmacopéia Brasileira (1959) e de Prista, Alves e Morgado (1983). Como mostram os esquemas das **Figuras 1 e 2**, as partes aéreas foram submetidas à secagem em estufa com circulação de ar em condições padronizadas de 40 °C, por um dia, e as sementes foram submetidas a secagem ao ar, em temperatura ambiente, por cerca de 20 dias. Depois de secas, as drogas vegetais foram trituradas separadamente em um moinho de facas e martelo (*Power Switch*), tamisadas em malha de 5 mm e então maceradas por 4h em etanol 75% (v/v), na proporção de uma parte da droga para três de solvente. Após a maceração, realizou-se uma percolação lenta do solvente, até o esgotamento total, o qual foi monitorado por cromatografia em camada delgada (CCD), de acordo com o **item 4.2.2.1**. Finalizada a extração com o solvente, o álcool foi eliminado por rotaevaporação a 40 °C e a água foi eliminada por liofilização. O **extrato hidroalcoólico de partes aéreas (EHPA)** e o **extrato hidroalcoólico das sementes (EHS)** foram pesados e guardados em um dessecador.

4.2.1.2. Extração de proteínas das sementes de *Senna occidentalis*

O resíduo de sementes resultante da percolação com a mistura hidroalcoólica (item 4.2.1.1) foi submetido à secagem ao ar e utilizado para a extração de proteínas, segundo Deutscher (1990) e Hebert *et al.* (1983). Como mostra o esquema da **Figura 2**, as sementes foram trituradas em almofariz com o emprego de nitrogênio líquido e depois em um triturador (*Sorvall*) com o emprego de tampão fosfato (PBS) 0,2 M, pH 7,3. As sementes foram então submetidas à maceração *over night* (ON) em solução tampão, a temperatura de 4 °C e sob agitação, empregando-se uma proporção de uma parte da droga para nove partes de PBS. Após a maceração, o **extrato bruto aquoso de sementes (EBaq)** foi filtrado diversas vezes, empregando-se gaze, papel de filtro e filtração a vácuo, até a obtenção de uma solução límpida. Depois, realizou-se o fracionamento de proteínas empregando a técnica de precipitação com sulfato de amônio [(NH₄)₂SO₄; 132,14 g/mol], a 25%, 50% e 75% (p/v) de saturação, temperatura ambiente e agitação constante. Os precipitados foram separados por centrifugação a 10000 rpm e 4 °C, por 15 min e então ressuspensos em água destilada, originando três frações protéicas: **fração 25% (FP25)**, **fração 50% (FP50)** e **fração 75% (FP75)**. As frações protéicas foram dialisadas (membrana *Spectra/por* MW 3,5 kDa) contra água destilada a 4 °C, até a eliminação total do sulfato de amônio. A eliminação do sal foi monitorada pelo teste qualitativo utilizando solução de BaCl₂ a 10% (p/v). Uma alíquota do extrato bruto aquoso de sementes e as três frações protéicas foram liofilizadas. O material liofilizado foi pesado e guardado a – 20 °C.

Figura 1. Esquema de obtenção do extrato hidroalcoólico de partes aéreas de *S. occidentalis*

Figura 2. Esquema de obtenção do extrato hidroalcoólico e frações protéicas de sementes de *S. occidentalis*

4.2.2. Caracterização físico-química dos extratos de *Senna occidentalis*

4.2.2.1. Cromatografia em camada delgada (CCD) dos extratos hidroalcoólicos

Foi utilizada como fase estacionária uma placa de vidro de 20 x 15 cm preparada com 0,3 mm de espessura de sílica gel 60 (*Merck*) e como fase móvel uma mistura de solventes contendo acetato de etila, metanol e água (10: 1,35: 1). O extrato hidroalcoólico de partes aéreas (10 mg/mL de metanol), o extrato hidroalcoólico de sementes (10 mg/mL de metanol) e os padrões 1,8 – hidroxiantraquinona (1 mg/mL de éter) e quercetina (1 mg/mL de acetato de etila) foram aplicados com capilar. Após uma corrida ascendente de 12,5 cm, foi realizada a detecção em luz UV (365 nm) e revelações com KOH 0,1N e NP 1% (p/v) em etanol (WAGNER e BLADT, 1996).

4.2.2.2. Determinação do conteúdo protéico do extrato bruto aquoso e das frações de sementes de *Senna occidentalis*

O extrato bruto aquoso, a fração 25%, a fração 50% e a fração 75% de sementes de *S. occidentalis* foram diluídos adequadamente em tampão fosfato (PBS) e o conteúdo protéico dos mesmos foi estimado pelo método de *Lowry* modificado. As leituras de absorbância foram feitas no espectrofotômetro *B328 Micronal*, empregando comprimento de onda de 660 nm. Os teores protéicos das amostras foram calculados em comparação com uma solução padrão de albumina bovina sérica (BSA) 1 mg/mL (DEUTSCHER, 1990).

4.2.2.3. Teste de hemaglutinação do extrato bruto aquoso e das frações de sementes de *Senna occidentalis*

Os componentes protéicos extraídos das sementes de *S. occidentalis* foram avaliados quanto à capacidade de aglutinar células sanguíneas. Foram empregados eritrócitos humanos do tipo O, de acordo com o protocolo previamente aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto Biológico (**Anexo**). O sangue foi adequadamente extraído por via venosa e colocado em tubo contendo heparina. As hemácias foram separadas do plasma por centrifugação a 3000 rpm, por 15 min e lavadas três vezes

utilizando solução fisiológica (solução salina; NaCl 0,85%) e centrifugação a 3000 rpm por 10 min. O ensaio foi realizado em microplaca de hemaglutinação com 96 poços, segundo Pinto FCR *et al.* (2005). O padrão de lectina purificada de *Dioclea grandiflora* (2,35 mg/mL de solução fisiológica) foi utilizado como controle positivo e a solução fisiológica foi utilizada como controle negativo. As amostras (extrato bruto aquoso, fração protéica 25%, fração protéica 50% e fração protéica 75% de sementes de *S. occidentalis*) foram adequadamente diluídas em solução fisiológica. Foram aplicados nos poços 50 µL de cada amostra e controle. Uma diluição seriada foi realizada em solução fisiológica, na razão de dois. Ao final, 50 µL de suspensão de hemácias a 1% (v/v) em PBS foram adicionados em todos os poços.

4.2.3. Screening da atividade antimicrobiana dos extratos de *Senna occidentalis*

Para a avaliação da atividade antimicrobiana foi utilizado o método de diluição em meio líquido, adaptado para o uso de microplacas, segundo Eloff (1998). Foram empregados microrganismos padrões preconizados em cosméticos, segundo os compêndios oficiais de Farmácia (JAPANESE PHARMACOPOEIA, 2001; COSMETIC, TOILETRY AND FRAGRANCE ASSOCIATION, 2001; BRITISH PHARMACOPOEIA, 1999; UNITED STATES PHARMACOPOEIA, 2005). Os procedimentos foram realizados com técnicas assépticas e materiais esterilizados por calor seco e calor úmido.

4.2.3.1. Microrganismos

As cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Aspergillus niger* (ATCC 16404) foram adquiridas do Laboratório de Materiais de Referência do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) ou da Seção de Coleção de Culturas do Instituto Adolfo Lutz. A partir de cada cepa foram realizados no máximo seis repiques, renovados mensalmente. Foram empregadas apenas culturas recentes para a realização dos ensaios.

4.2.3.2. Meios de cultura e condições de incubação

Para o cultivo das bactérias foram utilizados caldo caseína soja (TSB), caldo *Mueller Hinton* (MH) e ágar caseína soja (TSA) e incubação a 35-37 °C por 24 h. Para o cultivo dos fungos foram utilizados caldo *Sabouraud* dextrose (SDB) e ágar *Sabouraud* dextrose (SDA) e incubação a 25 °C por 48h.

4.2.3.3. Preparo e avaliação da viabilidade do inóculo

Após procedimento adequado de reidratação da cultura liofilizada, o microrganismo foi reativado em meio líquido e repicado em meio sólido inclinado (*slant*). A massa celular referente à fase logarítmica foi recolhida em solução fisiológica. No caso do *A. niger*, esta etapa foi auxiliada pelo emprego de pérolas de vidro e *Tween 80* (polisorbato 80) a 0,1% (v/v). A suspensão-mãe do microrganismo-teste foi padronizada por contagem do número de colônias, utilizando-se o método de diluições decimais seriadas e plaqueamento *pour plate*. Para o ensaio de avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos de *S. occidentalis* (item 4.2.3.6), a suspensão microbiana foi diluída adequadamente, de modo a obter um inóculo de aproximadamente 10^4 UFC/200 µL. A viabilidade do microrganismo foi confirmada por plaqueamento de diluição adequada do inóculo ao final de cada experimento.

4.2.3.4. Controles positivos

Foram empregadas soluções previamente validadas de padrões secundários de cloranfenicol, amicacina e nistatina, na concentração de 1 mg/mL.

4.2.3.5. Amostras

As soluções-estoque do extrato hidroalcoólico de partes aéreas e do extrato hidroalcoólico de sementes de *S. occidentalis* foram preparadas na concentração de 60 mg/mL de dimetilsulfóxido/metanol (DMSO/MeOH ou D/M). As soluções-estoque do extrato bruto aquoso, fração protéica 25%, fração protéica 50% e fração protéica 75% de sementes de *S. occidentalis* foram preparadas na concentração de 20 mg/mL de PBS. Os solventes utilizados foram previamente validados.

4.2.3.6. Ensaio da concentração mínima inibitória (MIC)

Para a realização deste ensaio foi empregada a técnica de diluição em meios líquidos adaptada para microplacas de 96 poços, segundo Eloff (1998), sendo analisadas réplicas das amostras e controles em uma mesma microplaca. Os volumes de aplicação do inóculo, amostras e controles foram previamente validados, sendo o volume final de cada poço de 200 μ L. O teste incluiu os seguintes controles: esterilidade do meio (200 μ L de meio de cultura); crescimento microbiano (200 μ L de meio de cultura inoculado); negativo (10-20 μ L do diluente da amostra e 180-190 μ L de meio de cultura inoculado); positivo (10-20 μ L de antibiótico e 180-190 μ L de meio de cultura inoculado) e cor da amostra (10-20 μ L do extrato e 180-190 μ L de meio de cultura). As soluções-estoque dos extratos foram adequadamente diluídas de modo que fossem testadas amostras com concentrações de 0,05 a 0,4% (p/v). Os microrganismos-teste foram desafiados utilizando-se 10-20 μ L de cada amostra e 180-190 μ L de meio de cultura inoculado. Após a incubação, a microplaca foi submetida à agitação, seguida da leitura espectrofotométrica em leitor de ELISA com medida da absorbância em comprimento de onda de 630 nm.

4.2.4. Avaliação da atividade citotóxica dos extratos hidroalcoólicos de *Senna occidentalis*

Os ensaios para a avaliação da citotoxicidade foram realizados de acordo com o protocolo previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (**Anexo**). Foram utilizadas técnicas assépticas e materiais esterilizados por filtração, calor seco, calor úmido, radiação ou óxido de etileno, de acordo com a natureza de cada um.

4.2.4.1. Linhagem celular

Empregou-se uma linhagem de fibroblastos NIH-3T3, obtida de pele de camundongos Balb/C. As células foram cultivadas em meio de cultura D10, ou seja, meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) contendo 10% de soro bovino, além de penicilina-estreptomicina (50 UI/mL) e glutamina (4 mM).

4.2.4.2. Amostras

As soluções-estoque dos extratos foram preparadas na concentração de 300 mg/mL de DMSO/MeOH. Para a realização do ensaio (item 4.2.4.3), essas soluções foram filtradas em membrana 0,45 μ m e diluídas adequadamente em meio de cultura, de maneira que a concentração final de DMSO/MeOH não interferisse na viabilidade celular e fossem obtidas as seguintes concentrações-teste: 60,0; 30,0; 15,0; 7,5; 3,75; 1,9; 0,9 e 0,05 mg/mL.

4.2.4.3. Teste de viabilidade celular empregando MTS

Os ensaios foram realizados segundo os manuais da NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH (2001) e PROMEGA (2001). As culturas celulares semiconfluentes, acondicionadas em solução criopreservante (-50°C), foram submetidas à tripsinização e semeadas na microplaca de 96 poços, em uma densidade de aproximadamente 10^4 células/120 μ L de meio D10 em cada poço. As microplacas foram incubadas por 24 h, a 37°C , 5% de CO_2 e 95% de umidade relativa, para o desenvolvimento e adesão celular. Depois disso, o meio de cultura de todos os poços foi retirado e 100 μ L de meio de cultura novo foram adicionados nos poços referentes ao controle de viabilidade celular 100%. Nos demais poços, foram colocados 100 μ L de cada diluição das amostras, em réplicas. Após incubação por 24 h, nas condições já mencionadas, certas replicatas-teste foram retiradas, sendo os poços em que estavam lavados três vezes com solução fisiológica e completados com 100 μ L de meio de cultura. Outras replicatas-teste permaneceram mais 24 h em incubação, ou seja, ficaram 48 h em contato com as células. Após este período, o conteúdo de todos os poços foi retirado da microplaca e estes foram lavados três vezes com solução fisiológica. Depois, foram colocados em cada um dos poços 100 μ L de meio de cultura e 20 μ L de solução MTS/PMS/D10. A placa foi incubada por 2 h, a 37°C , 5% de CO_2 e 95% de umidade relativa. Finalmente, foi feita a leitura espectrofotométrica em leitor de ELISA, com medida de absorbância em comprimento de onda de 490 nm.

4.2.5. Avaliação da atividade antioxidante dos extratos de *Senna occidentalis* pelo método do seqüestro do radical DPPH

Os ensaios foram realizados segundo Bondet, Brand-Williams e Berset (1997), com adaptação para o uso de microplacas de 96 poços e leitor de ELISA. As soluções-estoque do extrato hidroalcoólico de partes aéreas e do extrato hidroalcoólico de sementes de *S. occidentalis* foram preparadas na concentração de 20 mg/mL de DMSO/MeOH (dimetilsulfóxido/metanol). As soluções do extrato bruto aquoso, fração protéica 25%, fração protéica 50% e fração protéica 75% de sementes de *S. occidentalis* foram preparadas na concentração de 10 mg/mL de solução fisiológica. Para a realização do ensaio, todas as soluções-estoque foram diluídas dez vezes em água destilada. Um padrão de *trolox-C* (6-hidróxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico; 250,29 g/mol) solubilizado em metanol foi empregado como controle positivo do ensaio, na concentração correspondente ao seqüestro de 50% do radical livre (EC_{50}), conforme uma curva-padrão. O volume de aplicação das amostras e do padrão foi de 100 μ L, em quadruplicata. A solução de 1,1-difenil-2-picril-hidrazila (DPPH; 394,32 g/mol) foi preparada em metanol, na concentração de 300 μ M, sendo utilizada 100 μ L desta solução em todos os poços. Nos poços reservados para o controle de 100% de radical livre, foram colocados 200 μ L da solução de DPPH, em quintuplicata (absorbância de 0,5 a 0,6). Após agitação, a microplaca permaneceu 1 h em ambiente escuro e com temperatura de aproximadamente 15 °C. Finalmente, a microplaca foi submetida à leitura espectrofotométrica em leitor de ELISA, com medida da absorbância em comprimento de onda de 515 nm.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A extração hidroalcoólica de partes aéreas de *S. occidentalis*, em sua maior parte composta de folhas, apresentou um rendimento de 0,23 g de extrato/g de droga vegetal e a de sementes 0,12 g de extrato/g de droga vegetal (**Tabela I**). Neste caso, a extração de partes aéreas necessitou de praticamente o dobro de solvente para esgotar a droga, quando comparada com a extração de sementes, sendo obtido, proporcionalmente, quase o dobro de extrato hidroalcoólico de partes aéreas. As características organolépticas e visuais dos extratos foram: fragmentos de coloração verde escuro (partes aéreas) ou marrom escuro (sementes), brilhantes, higroscópicos e com odor característico.

Os extratos hidroalcoólicos de *S. occidentalis* foram caracterizados quanto à presença de antraquinonas e flavonóides, substâncias que são muito freqüentes no gênero *Cassia*, segundo Viegas Jr. (2006). Embora a concentração de antraquinonas glicosiladas não tenha sido detectável no extrato hidroalcoólico de partes aéreas por CCD (**Tabela I**), antraquinonas livres podem estar presentes em fração apolar, o que não foi verificado no atual trabalho. De fato, a presença dessa classe de componentes em folhas já foi mostrada por Ogunkunle e Ladejobi (2006). Assim, as diferenças de resultado podem ser explicadas por fatores relacionados à origem da planta e por variações nos métodos de extração e caracterização fitoquímica. Além disso, é preciso considerar que o conteúdo de antraquinonas é bem maior nas sementes do que nas folhas e nas raízes, conforme foi mostrado por Rai e Shok (1983). Os componentes antraquinônicos se mostraram presentes no extrato hidroalcoólico de sementes, sendo observado o aparecimento de uma mancha ou *spot* de Rf 9 cm, com cor amarela após detecção por luz UV e cor rosa após a revelação com hidróxido de potássio; características essas comparáveis ao padrão de antraquinona empregado. A presença de antraquinonas em sementes de *S. occidentalis* foi anteriormente mostrada por Shah e Shinde (1969), Kean *et al.* (1971), Haraguchi *et al.* (1998) e Al-Warhi, Al-Hazimi e Hussain (2003).

O extrato hidroalcoólico de partes aéreas e o extrato hidroalcoólico de sementes apresentaram flavonóides em suas composições (**Tabela I**), havendo o aparecimento de uma mancha ou *spot* de Rf 3,7 cm e cor amarela após a revelação com NP, comparável ao padrão de flavonóide empregado, além de outras manchas fluorescentes indicativas de componentes flavonoídicos. Não foram encontrados

dados na literatura que demonstrem a predominância de flavonóides em sementes de *S. occidentalis*. Já a presença desses componentes em folhas foi mostrada por Anton e Duquénois (1968), Tiwari e Singh (1977), Hatano *et al.* (1999), Purwar *et al.* (2003), Ogunkunle e Ladejobi (2006).

O extrato hidroalcoólico de sementes e o extrato hidroalcoólico de partes aéreas não foram submetidos ao fracionamento dos metabólitos secundários (frações de hexano, clorofórmio, acetato de etila e butanol), devido à possibilidade de ocorrência de atividade antimicrobiana pela sinergia de mais de um componente químico presente no extrato total, o que pode também favorecer o perfil toxicológico do insumo vegetal. Foi considerada também a relação custo e benefício, sendo o extrato bruto uma escolha mais adequada do que as suas frações no desenvolvimento de produtos.

Tabela I – Rendimento da extração hidroalcoólica de partes de *S.occidentalis* e caracterização fitoquímica dos extratos

Parte da planta	Quantidade (g)	Volume percolado (L)	Massa de liofilizado (g)	Rendimento (g de extrato/g de droga vegetal)	Antraquinona	Flavonóide
Partes aéreas ^a	145,24	2,57	34,00	0,23	(-)	(+)
Sementes	156,26	1,30	19,32	0,12	(+)	(+)

a) as partes aéreas foram compostas de: 0,65 g de flores; 2,65 g de frutos jovens; 8,56g de caules e 133,38 g de folhas e pecíolos
(+) presença; (-) ausência

Por ser um órgão de reserva das plantas, as sementes constituem um material muito rico em proteínas, especialmente as sementes de leguminosas. Trabalhos anteriores já demonstraram estudos iniciais sobre as atividades biológicas de proteínas e toxinas peptídicas extraídas de sementes de *S. occidentalis* (LOMBARDO *et al.*, 2003, 2004a, 2004b, PINTO FCR *et al.*, 2005, FRANÇA *et al.*, 2005).

No presente trabalho, a extração de proteínas das sementes de *S. occidentalis* foi realizada com a droga vegetal submetida à extração hidroalcoólica, tendo em vista a eliminação prévia de substâncias interferentes, como pigmentos e carboidratos, pela percolação com etanol (Figura 2).

Partindo-se de 20 g de sementes obteve-se aproximadamente 300 mL de extrato bruto aquoso, com coloração amarela e límpida, o qual foi utilizado para o fracionamento de proteínas e peptídeos (**Tabela II**).

De acordo com a **Tabela II**, as concentrações protéicas estimadas pelo método de Lowry, em equivalentes de 1 mg de BSA/mL foram: 0,58 mg/mL (extrato bruto aquoso); 0,39 mg/mL (Fração 25%); 0,21 mg/mL (Fração 50%) e 1,29 mg/mL (Fração 75%). A fração 25% e a fração 75% mostraram conter maior quantidade de componentes protéicos do que a fração 50%, sugerindo que a maioria das proteínas presentes nas sementes de *S. occidentalis* tem característica pouco polar (hidrofóbicas, com pouca água de solvatação) ou muito polares (hidrofilicas, com muita água de solvatação). Antes de iniciar o fracionamento, uma alíquota de 20 mL do extrato bruto aquoso foi liofilizada, resultando em 529,30 mg. As três frações obtidas do extrato bruto aquoso foram dialisadas e liofilizadas, resultando nas seguintes massas: 1002,40 mg (Fração 25%); 665,20 mg (Fração 50%) e 207,70 mg (Fração 75%). O material liofilizado se apresentou com aspecto de isopor, leve e esbranquiçado. Os rendimentos da extração em mg de proteína/g de semente, foram: 8,7 (extrato bruto); 2,24 (Fração 25%); 0,83 (Fração 50%) e 2,13 (Fração 75%). Assim, verificou-se a ocorrência de perdas protéicas durante o fracionamento, pois o rendimento das três frações (5,2 mg de proteína/g de semente) corresponde a 59,77% das proteínas totais do extrato bruto. Com base nestes resultados foram calculadas as seguintes porcentagens de proteínas totais em relação às massas de liofilizado de cada amostra: 2,85% (extrato bruto aquoso); 4,47% (Fração 25%); 2,49% (Fração 50%) e 20,5% (Fração 75%).

Tabela II – Rendimento da extração de proteínas de sementes de *S. occidentalis*

Amostra	Volume (mL)	Concentração protéica (mg/mL) ^a	Massa de liofilizado (mg)	Rendimento protéico (mg de proteína/g de semente)
Extrato bruto aquoso	300,00	0,58	529,30 ^b	8,70 ^c
Fração 25%	115,00	0,39	1002,40	2,24
Fração 50%	79,00	0,21	665,20	0,83
Fração 75%	33,00	1,29	207,70	2,13

a) valores estimados pelo método de Lowry em equivalentes de BSA 1 mg/mL

b) valor referente a uma alíquota de 20 mL

c) valor calculado em relação ao volume total de 300 mL

O extrato bruto aquoso de sementes de *S. occidentalis* e suas frações protéicas foram caracterizados quanto à presença de lectinas pelo teste de hemaglutinação.

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imune que interagem de maneira reversível e específica com carboidratos da parede celular de eritrócitos, provocando a aglutinação dos mesmos (LEHNINGER, 1991; KENNEDY *et al.*, 1995; LORIS *et al.*, 1998). A maioria das lectinas de origem vegetal, ou fitohemaglutininas, são obtidas de sementes de leguminosas e constituem cerca de 10% das proteínas totais (RABIJNS, 2000; LORIS, 2002; SHARON e LIS, 2004; ALENCAR *et al.*, 2005). Diversos trabalhos indicam que elas são proteínas de defesa das plantas contra animais herbívoros, insetos e fungos (CAVADA *et al.*, 2001; SANTOS, PEIXOTO e COELHO, 2004). A propriedade hemaglutinante de lectinas de leguminosas é considerada como um fator antinutricional que pode ser deletério ou tóxico aos homens e animais (LIENER *et al.*, 1994; PINTO LS *et al.*, 2005). Além de funções fisiológicas importantes, as lectinas também despertam grande interesse biotecnológico, podendo ser muito úteis na área da pesquisa e desenvolvimento. A aplicação dessas moléculas como ferramentas para diagnósticos médicos é muito relevante, devido à capacidade de ligação a certas células do sangue e transportadores celulares especializados (RINI, 1995; ADAMS, 1996).

De acordo com a triagem realizada por Pinto FCR *et al.* (2005), os componentes protéicos de sementes de *S. occidentalis* demonstraram ter especificidade para o antígeno O, ou seja, pelas cadeias de açúcar fucose de hemácias O, além de outros tipos sanguíneos. No presente trabalho, o sangue humano tipo O foi escolhido para o teste das amostras em estudo.

A **Tabela III** mostra os resultados do teste de hemaglutinação do extrato bruto aquoso, fração protéica 25%, fração protéica 50% e fração protéica 75% de sementes de *S. occidentalis*. Os resultados positivos para a presença de lectinas corroboram com o trabalho anterior de Pinto FCR *et al.* (2005). Como esperado, as frações protéicas apresentaram maior atividade que o extrato bruto aquoso, sendo isto um indicativo de que o fracionamento do extrato bruto tenha levado à concentração de proteínas da classe das lectinas nas frações. A fração 50% necessitou de menor quantidade de proteínas (5,25 µg) para causar aglutinação das células, quando comparada com o extrato bruto aquoso (14,50 µg), a fração 25% (9,75 µg) e a fração 75% (8,06 µg). Portanto, a fração 50% apresentou maior

potência hemaglutinante (0,19 UH/ μ g) em relação ao extrato bruto aquoso (0,07 UH/ μ g), a fração 25% (0,10 UH/ μ g) e a fração 75% (0,12 μ g). Verificou-se que as frações 25% e 75% foram cerca de duas vezes menos potentes que a fração 50% e que todas as amostras foram aproximadamente 40 vezes menos potentes que a lectina padrão, já que esta última é uma proteína purificada.

Tabela III – Atividade hemaglutinante do extrato bruto aquoso e das frações protéicas de sementes de *S. occidentalis*, empregando hemácias humanas tipo O

Amostra	Concentração protéica inicial (μ g)	Título (UH/50 μ L) ^b	Quantidade hemaglutinante (μ g)	Potência hemaglutinante (UH/ μ g)
Extrato bruto aquoso	14,50	1	14,50	0,07
Fração 25%	9,75	1	9,75	0,10
Fração 50%	5,25	1	5,25	0,19
Fração 75%	16,12	2	8,06	0,12
Lectina padrão ^a	5,87	16	0,37	2,73

a) padrão de lectina purificada de *Dioclea grandiflora* (2,35 mg/mL de salina)

b) inverso da maior diluição da amostra capaz de aglutinar eritrócitos, expresso como unidade hemaglutinante (UH) em 50 μ L

No estudo sobre a atividade antimicrobiana dos extratos de *S. occidentalis* realizou-se primeiramente a avaliação dos controles negativos do teste, ou seja, das concentrações dos diluentes das amostras (item 4.2.3.5 de **Material e Métodos**), de modo que não houvesse interferência significativa no crescimento de *S. aureus* (**Figura 3**), *E. coli* (**Figura 4**), *P. aeruginosa* (**Figura 5**), *C. albicans* (**Figura 6**) e *A. niger* (**Figura 7**). Neste caso, considerou-se como adequado uma recuperação maior ou igual a 80% da população microbiana, a qual foi padronizada em uma carga de 10⁴ UFC/poço. Além disso, cada microrganismo foi avaliado quanto à sensibilidade ao antibiótico padrão, a fim de validar o controle positivo do teste (**Figuras 3 a 7**).

Uma recuperação adequada dos microrganismos foi obtida frente aos diluentes D/M (volume de aplicação 10 μ L) e PBS (volume de aplicação 20 μ L), que variou de 80,2% (*E.coli* frente ao PBS – **Figura 4**) a 124,32% (*S. aureus* frente ao PBS – **Figura 3**) e esse protocolo foi então validado. Já o emprego de 20 μ L do sistema de solventes D/M não foi adequado, pois resultou em um decaimento de *S. aureus* (**Figura 3**), *P. aeruginosa* (**Figura 4**) e *C. albicans* (**Figura 5**) em 30,5%, 24,25% e 39,11% respectivamente e, portanto, em recuperações menores que 80% da

população microbiana. Avaliações preliminares utilizando mais que 1% de *Tween 80* (polisorbato 80) ou PEG como agentes coadjuvantes na dispersão do extrato também causaram toxicidade às cepas, assim, estes não foram utilizados no preparo das amostras-teste.

As soluções dos antibióticos cloranfenicol (*S. aureus* - **Figura 3** e *E. coli* - **Figura 4**), amicacina (*P. aeruginosa* - **Figura 5**) e nistatina (*C. albicans* - **Figura 6** e *A. niger* - **Figura 7**) na concentração de 10 µg/poço foram eficazes na redução da população microbiana, sendo observado o crescimento máximo de 9,45% de *A. niger*, bolor altamente resistente (**Figura 7**).

Figura 3. Recuperação de *S. aureus* frente aos diluentes das amostras e padrão de antibiótico

Condições experimentais – microplaca de 96 poços; volume final de cada poço: 200 µL; inóculo: *Staphylococcus aureus* 10⁴ UFC/poço; meio de cultura: caldo *Müller Hinton*; amostras e volumes de aplicação: DMSO/MeOH 10 µL (D/M 10), DMSO/MeOH 20 µL (D/M 20), PBS 20 µL (PBS 20); antibiótico padrão e volume de aplicação: cloranfenicol (1 mg/mL) 10 µL; incubação: 37 °C por 24 h; comprimento de onda de detecção: 660 nm.

Figura 4. Recuperação de *E. coli* frente aos diluentes das amostras e padrão de antibiótico

Condições experimentais – microplaca de 96 poços; volume final de cada poço: 200 μ L; inóculo: *Escherichia coli* 10^4 UFC/poço; meio de cultura: caldo *Müller Hinton*; amostras e volumes de aplicação: DMSO/MeOH 10 μ L (D/M 10), DMSO/MeOH 20 μ L (D/M 20), PBS 20 μ L (PBS 20); antibiótico padrão e volume de aplicação: cloranfenicol (1 mg/mL) 10 μ L; incubação: 37 °C por 24 h; comprimento de onda de detecção: 660 nm.

Figura 5. Recuperação de *P. aeruginosa* frente aos diluentes das amostras e padrão de antibiótico

Condições experimentais – microplaca de 96 poços; volume final de cada poço: 200 μ L; inóculo: *Pseudomonas aeruginosa* 10^4 UFC/poço; meio de cultura: *Müller Hinton*; amostras e volumes de aplicação: DMSO/MeOH 10 μ L (D/M 10), DMSO/MeOH 20 μ L (D/M 20), PBS 20 μ L (PBS 20); antibiótico padrão e volume de aplicação: amicacina (1 mg/mL) 10 μ L; incubação: 37 °C por 24 h; comprimento de onda de detecção: 660 nm.

Figura 6. Recuperação de *C. albicans* frente aos diluentes das amostras e padrão de antibiótico

Condições experimentais – microplaca de 96 poços; volume final de cada poço: 200 μ L; inóculo: *Candida albicans* 10^4 UFC/poço; meio de cultura: SDB; amostras e volumes de aplicação: DMSO/MeOH 10 μ L (D/M 10), DMSO/MeOH 20 μ L (D/M 20), PBS 20 μ L (PBS 20); antibiótico padrão e volume de aplicação: nistatina (1 mg/mL) 10 μ L; incubação: 25 °C por 48 h; comprimento de onda de detecção: 660 nm.

Figura 7. Recuperação de *A. niger* frente aos diluentes das amostras e padrão de antibiótico

Condições experimentais – microplaca de 96 poços; volume final de cada poço: 200 μ L; inóculo: *Aspergillus niger* 10^4 UFC/poço; meio de cultura: SDB; amostras e volumes de aplicação: DMSO/MeOH 10 μ L (D/M 10), DMSO/MeOH 20 μ L (D/M 20), PBS 20 μ L (PBS 20); antibiótico padrão e volume de aplicação: nistatina (1 mg/mL) 10 μ L; incubação: 25 °C por 48 h; comprimento de onda de detecção: 660 nm.

Após a validação dos controles negativo e positivo do ensaio de atividade antimicrobiana, os extratos de *S. occidentalis* foram avaliados quanto à propriedade inibitória de bactérias e fungos, considerando a possibilidade de aplicação dos mesmos como agente conservante ou substância ativa de formulações tópicas.

Segundo Pinto, Kaneko e Ohara (2003), os conservantes sintéticos de formulações farmacêuticas e cosméticas são usados em concentrações reduzidas, para que não ocorra interferência na estabilidade física e físico-química do produto. Essas concentrações variam de 0,01 a 1%, dependendo da classe a que pertence o agente conservante.

Além de considerarmos a faixa de concentração usual dos conservantes, esta também se limitou à solubilidade máxima dos extratos no solvente adequado. As amostras foram testadas em concentrações crescentes até no máximo 0,4% (p/v). A **Tabela IV** mostra os resultados das mínimas concentrações inibitórias, sendo de 0,1% (p/v) para o extrato bruto aquoso de sementes, fração protéica 25%, fração protéica 50% e fração protéica 75% e de 0,3% (p/v) para os extratos hidroalcoólicos de sementes e de partes aéreas.

A maioria das lectinas de plantas possui especificidade por carboidratos simples ou complexos, através de interações hidrofóbicas reversíveis entre um domínio não catalítico da proteína e resíduos de monossacarídeos (KENNEDY *et al.*, 1995; PEUMANS e VAN DAMME, 1995; LORIS *et al.*, 1998; DWEK e BUTTERS, 2002). A fim de evitar a interação das lectinas extraídas das sementes de *S. occidentalis* (**Tabela III**) com a glicose presente no meio e uma conseqüente inibição da atividade biológica, o meio de cultura utilizado nos ensaios com bactérias foi substituído pelo caldo Müller Hinton (MH) ao invés do caldo caseína soja (TSB). O caldo MH contém como fonte de carboidrato o amido, enquanto o caldo TSB a glicose, açúcar pelo qual as amostras demonstraram ter especificidade de ligação em avaliações prévias.

O extrato bruto aquoso de sementes levou a redução da população de *S. aureus* e *E. coli* em 42% e 32%, respectivamente. Dentre as suas frações protéicas, somente a fração 75% demonstrou atividade, reduzindo a população de *E. coli* em 46% (**Tabela IV**). Este resultado sugere a seletividade de componentes de natureza protéica e com características hidrofílicas na inibição de uma bactéria Gram-negativa. De fato, a composição da parede celular microbiana é um fator determinante no mecanismo de ação de substâncias com ação antimicrobiana.

O extrato hidroalcoólico de sementes inibiu o crescimento de *S. aureus* (47%), *E. coli* (35%) e *P. aeruginosa* (78%), enquanto o extrato hidroalcoólico de partes aéreas inibiu o crescimento de *S. aureus* (52%) e *P. aeruginosa* (59%). Assim, foi verificado que a *E. coli* não apresentou sensibilidade frente a componentes extraídos das partes aéreas da planta, diferentemente do que foi observado para as amostras obtidas das sementes (extrato bruto aquoso de sementes, fração protéica 75% e extrato hidroalcoólico de sementes). Quanto aos fungos, nenhuma das amostras apresentou atividade satisfatória contra *C. albicans* e somente os extratos hidroalcoólicos de sementes e de partes aéreas foram ativos contra *A. niger* (Tabela IV).

Os resultados mostram que os extratos hidroalcoólicos (EHS e EHPA) apresentaram um maior espectro de ação em relação ao extrato aquoso e suas frações (Ebaq, FP25, FP50 e FP75). Estes últimos não demonstraram atividade antimicrobiana relevante, mesmo utilizando um protocolo de extração diferente do descrito em Lombardo *et al.* (2004a). Em alguns casos, maiores concentrações das frações protéicas propiciaram o crescimento microbiano e a explicação para isso pode ser a presença de componentes úteis ao metabolismo dos microrganismos, como por exemplo, os carboidratos, os quais são muito ricos nas sementes e também solúveis em extrações aquosas. Isto indica, apesar de demandar maior período de tempo e resultar em baixos rendimentos, a necessidade de purificação das frações para uma avaliação criteriosa da atividade antimicrobiana de componentes protéicos isolados. As divergências observadas entre o presente trabalho e o trabalho anterior podem ser devidas às diferenças na técnica e critérios de avaliação adotados.

O melhor potencial antimicrobiano foi demonstrado pelo extrato hidroalcoólico de sementes de *S. occidentalis*, principalmente contra a *P. aeruginosa*, cuja redução de crescimento foi em 78% (Tabela IV). A *P. aeruginosa* é um microrganismo de grande interesse na indústria farmacêutica e cosmética, podendo ser responsável por graves consequências à estabilidade do produto e à segurança do consumidor. De acordo com Marcondes (2002), o gênero *Pseudomonas* foi detectado como o principal contaminante das águas utilizadas na produção de cosméticos e formulações magistrais, seguido do grupo de coliformes.

É importante ressaltar que os dados de MIC não prevêm a influência das matérias-primas na formulação, muitas das quais apresentam multifuncionalidade,

como, por exemplo, o monoestearato de glicerila. Este tensoativo possui propriedades anfifílicas e atua primariamente como hidratante e emoliente para a pele, mas também apresenta uma excelente performance microbiológica, podendo agir de maneira efetiva na preservação da formulação. Do outro lado, é preciso considerar as barreiras físico-químicas que a substância antimicrobiana irá enfrentar na formulação, tais como solubilidade e migração para a fase óleo. Assim, a formulação sempre deverá ser avaliada quanto à sua eficácia e no caso de um sistema conservante, realizar o teste de desafio ou *Challenge Test* (IBARRA e JOHNSON, 2008).

Tabela IV – Atividade antimicrobiana dos extratos de *S. occidentalis*

Amostra	Inibição da carga microbiana de 10 ⁴ UFC (%)					
	Concentração da amostra em % (p/v)	<i>S. aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>C.albicans</i>	<i>A. niger</i>
Extrato bruto aquoso de sementes	0,1	42	32	-	-	-
Fração 25%	0,1	-	-	-	-	-
Fração 50%	0,1	-	-	-	-	-
Fração 75%	0,1	-	46	-	-	-
Extrato hidroalcoólico de sementes	0,3	47	35	78	-	+/-
Extrato hidroalcoólico de partes aéreas	0,3	52	-	59	-	+/-

(-) = inibição menor que 20% e considerada não relevante

(+/-) = inibição moderada em avaliação qualitativa

O extrato hidroalcoólico de sementes e o extrato hidroalcoólico de partes aéreas de *S. occidentalis* foram os que apresentaram melhor eficácia antimicrobiana, em comparação com o extrato bruto aquoso e suas três frações protéicas (**Tabela IV**). Por isso, eles foram os selecionados para uma avaliação *in vitro* da toxicidade, visando à verificação preliminar da segurança desses extratos como possíveis insumos de formulações tópicas.

Como mostrado na **Figura 8**, todas as concentrações do extrato hidroalcoólico de partes aéreas de *S. occidentalis* (0,05 a 6,00 % p/v) causaram a morte da população de células, logo nas primeiras 24 h de tempo de contato da amostra com a cultura celular. Diferentemente, o extrato hidroalcoólico de sementes levou a um decaimento da viabilidade celular que foi proporcional ao aumento da concentração da amostra, após um período de 24 h de tempo de contato e este perfil de decaimento permaneceu semelhante após 48 h de tempo de contato. Os resultados sugeriram que uma concentração maior que 0,38% (p/v) do extrato hidroalcoólico de sementes pode ser considerada tóxica a fibroblastos, visto que a viabilidade celular passa a ser menor que 50% (IC₅₀).

Assim, os resultados deste experimento foram um indicativo de que o extrato hidroalcoólico de sementes de *S. occidentalis* não apresenta toxicidade na concentração de interesse (0,3% p/v - **Tabela IV**), quando em contato com uma cultura de fibroblastos. Uma avaliação mais detalhada da toxicidade das amostras é necessária, principalmente em relação ao extrato hidroalcoólico de partes aéreas, que se mostrou altamente tóxico, mas em condições que podem ser consideradas bastantes drásticas. Em se tratando de possível incorporação do extrato em formulações cosméticas, é preciso considerar que o contato do produto com a pele ocorrerá inicialmente no estrato córneo; tecido queratinizado e de proteção formado por células mais resistentes que os fibroblastos e que melhor mimetizam as condições para as substâncias que são aplicadas topicamente.

Figura 8. Atividade tóxica dos extratos hidroalcoólicos de *S. occidentalis* para fibroblastos

Condições experimentais – microplaca de 96 poços; volume final de cada poço: 120 μ L; inóculo: NIH-3T3 10^4 células/poço; meio de cultura: D10; amostras: extrato hidroalcoólico de sementes (EHS) e extrato hidroalcoólico de partes aéreas (EHPA); volume de aplicação das amostras: 100 μ L; concentrações das amostras (mg/100 μ L): 0.05, 0.09, 0.19, 0.38, 0.75, 1.5, 3.0 e 6.0; incubação: 37 °C, 5% CO₂, 95% UR por 24 e 48 h; reagente e volume de aplicação: MTS/PMS/D10, 20 μ L, tempo de reação: 2 h; comprimento de onda de detecção: 490 nm.

Os extratos de *S. occidentalis* (Ebaq, FP25, FP50, FP75, EHS e EHPA) também foram avaliados preliminarmente quanto à capacidade antioxidante, complementando este estudo. De acordo com a literatura, diversos trabalhos enfatizam a pesquisa de novos antioxidantes de origem natural, sendo esta propriedade principalmente atribuída aos compostos fenólicos extraídos de espécies vegetais. As substâncias antioxidantes podem ter grande utilidade no desenvolvimento de novos fármacos, alimentos funcionais ou coadjuvantes de formulações farmacêuticas, cosméticas e alimentícias.

A **Figura 9** mostra a curva-padrão obtida para o *trolox-C*, antioxidante utilizado como referência na avaliação da atividade das amostras. Nas condições do ensaio, foi determinado que a EC₅₀ do padrão, ou seja, a concentração necessária de *trolox-C* para o decaimento de 50% do radical livre DPPH, foi 25,3 μ M, o que equivale a 6,3 μ g/mL.

Os resultados sobre a capacidade de seqüestro do radical DPPH por componentes presentes nos extratos de *S. occidentalis* estão na **Figura 10**. As maiores porcentagens de decaimento do radical livre foram obtidas pela fração protéica 25% (52,43%), fração protéica 75% (51,09%), extrato hidroalcoólico de sementes (54,54%) e extrato hidroalcoólico de partes aéreas (69,25%). Contudo, essas amostras foram ativas nas concentrações de 1000 e 2000 µg/mL, o que corresponde à cerca de 160 e 320 vezes mais que a do padrão, indicando assim, uma baixa potência antioxidante.

Finalizando, é sugerida uma avaliação de menores concentrações das amostras, visto que pode ter ocorrido uma ação pró-oxidante, além de uma purificação das mesmas, a fim de eliminar substâncias interferentes e possibilitar uma avaliação mais criteriosa do potencial antioxidante dos componentes químicos. A presença de grande quantidade de pigmentos nos extratos, principalmente nos hidroalcoólicos, pode ter interferido na absorção de luz no comprimento de onda empregado, representando um fator limitante da técnica. Desse modo, novos protocolos devem ser conduzidos, e também estudos mais aprofundados utilizando métodos complementares.

Figura 9. Curva-padrão de *trolox-C*: calibração do método de seqüestro de radicais DPPH.

Condições experimentais – microplaca de 96 poços; volume final de cada poço: 200μL; volume de aplicação das amostras: 100 μL; amostras: padrão de *trolox-C* nas concentrações (μM): 3.5, 6.0, 7.5, 10.0, 20.0, 30.0, 40.0 e 50.0; radical livre e volume de aplicação: DPPH (300 μM), 100 μL; tempo de reação: 1 h; comprimento de onda de detecção: 515 nm.

Figura 10. Seqüestro de radicais DPPH pelos extratos protéicos e hidroalcoólicos de *S. occidentalis*

Condições experimentais – microplaca de 96 poços; volume final de cada poço: 200μL; volume de aplicação do padrão e das amostras: 100 μL; padrão: *trolox-C* (0,62 μg/100 μL); amostras: extrato bruto aquoso de sementes (EBaq), fração protéica 25% (FP25), fração protéica 50% (FP50), fração protéica 75% (FP75), extrato hidroalcoólico de sementes (EHS) e extrato hidroalcoólico de partes aéreas (EHPA); concentrações das amostras: 100 μg/100 μL (EBaq, FP25, FP50 e FP75) e 200 μg/100 μL (EHS e EHPA); radical livre e volume de aplicação: DPPH (300 μM), 100 μL; tempo de reação: 1 h; comprimento de onda de detecção: 515 nm.

Frente ao exposto, este trabalho pode mostrar que a *Senna occidentalis* L. (Link) é uma espécie com notável potencial farmacológico e importância na descoberta de novos produtos naturais aplicáveis ao desenvolvimento de produtos farmacêuticos e cosméticos. Em relação à pesquisa realizada neste projeto, são ressaltadas as constatações a seguir sumarizadas, as quais poderão conduzir a novas perspectivas no estudo dessa planta:

- os extratos aquosos e hidroalcoólicos de partes da *S. occidentalis* constituem um material muito rico em substâncias fitoquímicas biologicamente ativas, tais como proteínas, peptídeos e pigmentos fenólicos;
- o extrato aquoso de sementes da *S. occidentalis* e suas frações demonstraram conter componentes protéicos que podem pertencer à classe das lectinas, devido à atividade hemaglutinante, porém, essas frações não demonstraram atividade antimicrobiana e antioxidante relevantes, nas condições testadas;
- o extrato hidroalcoólico de partes aéreas da *S. occidentalis* demonstrou conter componentes flavonoídicos em sua composição, uma fraca atividade antioxidante, uma atividade antimicrobiana moderada e uma relevante atividade citotóxica, nas condições testadas;
- o extrato hidroalcoólico de sementes da *S. occidentalis* demonstrou conter componentes antraquinônicos e flavonoídicos em sua composição, uma fraca atividade antioxidante, um forte potencial antimicrobiano e citotoxicidade adequada, nas condições testadas.

6. CONCLUSÃO

O extrato hidroalcoólico de sementes a 0,3% (p/v) apresentou potencial antimicrobiano e toxicidade adequados, podendo ser um candidato para o uso em sistemas conservantes de preparações tópicas. Particularmente, esse extrato apresentou uma relevante atividade inibitória de *Pseudomonas aeruginosa*, sugerindo-se também, a possibilidade de uso deste extrato como princípio ativo natural de formulações de medicamentos específicos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHARYA, T.K.; CHATTERJEE, I.B. Isolation of chrysophanic acid-9-anthrone, the major antifungal principle of *Cassia tora*. *Lloydia*, v.38, p.218-220, 1975.

ADAMS, S. Special legumes may be an unopened medicine chest. *Agricultural Research*, v.44, n.11, p.12-14, nov., 1996.

ADEGOKE, G.O.; KUMAR, M.V.; KRISHNA, A.G.G.; VARADARAJ, M.C.; SAMBAIAH, K.; LOKESH, B.R. Antioxidants and lipid oxidation in foods: a critical appraisal. *Journal of Food Science and Technology*, v.35, n.4, p.283-298, 1998.

AGARKAR, S.V.; JADGE, D.R.; *Asian J. Chem.* **1999**, *11*, 295. *apud* VIEGAS JR., C.; REZENDE, A.; SILVA, D.H.S.; CASTRO-GAMBÔA, I.; BOLZANI, V.S. Aspectos químicos, biológicos e etnofarmacológicos do gênero *Cassia*. *Química Nova*, v.29, n.6, p.1279-1286, 2006.

AGARWAL, S.K.; SINGH, S.S.; VERMA, S.; KUMAR, S. Antifungal activity of anthraquinone derivatives from *Rheum emodi*. *Journal of Ethnopharmacology*, v.72, n.1-2, p.43-46, 2000.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. VisaLegis. Resolução RDC n.162, 11 de setembro de 2001. Estabelece a lista de substâncias de ação conservante para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>. Acesso em: 7 jul. 2008.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia para a avaliação de segurança de produtos cosméticos**. Brasília: Anvisa: 2003. 43p.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. VisaLegis. Resolução RDC n.211, 14 de julho de 2005. Ficam estabelecidas a definição e a classificação de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>. Acesso em: 7 jul. 2008.

AHERNE, S.A; O'BRIEN, N.M. Dietary flavonols: chemistry, food content and metabolism. *Nutrition*, v.18, n.1, p.75-81, 2002.

ALENCAR, V.B.M.; ALENCAR, M.N.N.; ASSREUY, A.M.S.; MOTA, M.L.; BRITO, G.A.C.; ARAGÃO, K.S.; BITTENCOURT, F.S.; PINTO, V.P.T.; DEBRAY, M.; RIBEIRO, R.A.; CAVADA, B.S. Pro-inflammatory effect of *Arum maculatum* lectin and role of resident cells. ***International Journal of Biochemistry and Cell Biology***, v.37, p.1805-1814, 2005.

ALI, M.S.; AZHAR, I.; AMTUL, Z.; AHMAD, V.U.; USMANGHANI, K. Antimicrobial screening of some *Caesalpinaceae*. ***Fitoterapia***, v.70, p.299-304, 1999.

ALMEIDA, C.F.C.B.R.; AMORIM, E.L.C.; ALBUQUERQUE, U.P.; MAIA, M.B.S. Medicinal plants popularly used in the Xingó region- a semi-arid location in Northeastern Brazil. ***Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine***, v.2, p.15, 2006.

AL-WARHI, T.L.; AL-HAZIMI, H.M.; HUSSAIN, S.A. Chemical constituents of branches and seeds of *Cassia occidentalis*. ***Journal of the Saudi Chemical Society***, v.7, n.3, p.423-442, 2003.

ANDERSON, J.E.; GOETZ, C.M.; McLAUGHLIN, J.L.; SUFFNESS, M. A blind comparison of simple bench-top bioassay and human tumour cell cytotoxicities and antitumor prescreens. ***Phytochemical Analysis***, v.2, n.3, p.107-111, 1991.

ANDREWS, J.M. Determination of minimum inhibitory concentrations. ***Journal of Antimicrobial Chemotherapy***, v.48, suppl.1, p.5-16, 2001.

ANESINI, C.; PEREZ, C. Screening of plants used in Argentine folk medicine for antimicrobial activity. ***Journal of Ethnopharmacology***, v.39, p.119-128, 1993.

ANTON, R.; DUQUÉNOIS, P. Contribution to the chemical study of *Cassia occidentalis*. ***Annales Pharmaceutiques Française***, v.26, n.11, p.673-680, 1968.

ANTUNES, A.J.; CANHOS, V. **Aditivos em alimentos**. 2.ed. Campinas: UNICAMP, 1984. 178p.

AVRDC: The World Vegetable Center. **AVRDC Progress Report 2002**. Shanhua: AVRDC Publication, 2003. 120p.

BARBOUR, E.; SAHRIF, M.; SAGHRAN, V.; HABRE, A.; TALHOUK, R.; TALHOUK, S. Screening of selected indigenous plants of Lebanon for antimicrobial activity. ***Journal of Ethnopharmacology***, v.93, p.1-7, 2004.

BARDHAN, P.; SHARMA, S.K.; GARG, N.K. *In vitro* effect of an Ayurvedic liver remedy on hepatic enzymes in carbon tetrachloride treated rats. **Indian Journal of Medical Research**, v.82, n.4, p.359-364, 1985.

BARROS, C.S.L.; ILHA, M.R.S.; BEZERRA JR., P.S.; LANGOHR, I.M.; KOMMERS, G.D. Intoxicação por *Senna occidentalis* (Leg. *Caesalpinoideae*) em bovinos em pastoreio. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.19, n.2, p.68-70, 1999.

BARRY, A.L.; THORNSBERRY, C. Susceptibility tests: diffusion test procedures. In: BALOWS, A.; HAUSER, W.J.; HERMANN, K.L.; ISENBERG, H.D.; SHAMODY, H.J. **Manual of clinical microbiology**. 5.ed. Washington: American Society for Microbiology, 1991. cap.111, p.1117-1125.

BARTH, A.T.; KOMMERS, G.D.; SALLES, M.S.; WOUTERS, F.; LOMBARDO de BARROS, C.S. Coffee *Senna* (*Senna occidentalis*) poisoning in cattle in Brazil. **Veterinary and Human Toxicology**, v.36, n.6, p.541-545, 1994.

BIN-HAFEEZ, B.; HAQUE, R.; RAISUDDIN, S. Protective effect of *Cassia occidentalis* L. on cyclophosphamide-induced suppression of humoral immunity in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.75, n.1, p.13-18, 2001.

BIRCH, A.E.; FENNER, G.P.; WATKINS, R.; BOYD, L.C. Antioxidant properties of evening primrose seed extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n.9, p.4502-4507, 2001.

BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. **Introdução à química de alimentos**. 2.ed. São Paulo: Varela, 1989. 222p.

BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. **Química do processamento de alimentos**. 2.ed. São Paulo: Varela, 1992. 151p.

BONDET, V.; BRAND-WILLIAM, W.; BERST, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v.30, n.6, p.609-615, 1997.

BOYETTE, C.D.; ABBAS, H.K.; CONNICK JR., W.J. Evaluation of *Fusarium oxysporum* as a potential bioherbicide for sicklepod (*Cassia obtusifolia*), coffee *Senna* (*Cassia occidentalis*) and hemp sesbania (*Sesbania exaltata*). **Weed Science**, v.41, n.4, p.678-681, 1993.

BRANDÃO, M.G.L.; GRANDI, T.S.M.; ROCHA, E.M.M.; SAWYER, D.R.; KRETTLI, A.U. Survey of medicinal plants used as antimalarial in the Amazon. *Journal of Ethnopharmacology*, v.36, p.175-182, 1992.

BRAND-WILLIAMS, W.; CURVELIER, M.E.; BERSET, C. Use a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, v.28, n.1, p.25-30, 1995.

BRENNA, O.V.; PAGLIARINI, E. Multivariate analyses of antioxidant power and polyphenolic composition in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.49, n.10, p.4841-4844, 2001.

BRITISH Pharmacopoeia. London: The Stationery Office, 1999. v.2, p. A266-A267.

BROEKAERT, W.F.; CAMMUE, B.P.A.; DEBOLLE, M.F.C.; THEVISSEN, K.; DESAMBLANX, G.W.; OSBORN, R.W. Antimicrobial peptide from plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v.16, n.3, p.297-323, 1997.

BURDA, S.; OLESZEK, W. Antioxidant and antiradical activities flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.49, n.6, p.2774-2779, 2001.

BURNS, J.; GARDNER, P.T.; MATTHEWS, D.; DUTHIE, G.G.; LEAN, M.E.J.; CROZIER, A. Extraction of phenolics and changes in antioxidant activity of red wines during vinification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.49, n.12, p.5797-5798, 2001.

BURNS, J.L.M.D.; SAIMAN, L.M.D. *Burkholderia cepacia* infections in cystic fibrosis. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, v.18, n.2, p.155-156, 1999.

CACERES, A.; LOPEZ, B.R.; GIRON, M.A.; LOGEMANN, H. Plants used in Guatemala for treatment of dermatophytic infections. 1. Screening for antimycotic activity of 44 plant extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, v.31, p.263-276, 1991.

CACERES, A.; LOPEZ, B.; JUAREZ, X.; DEL AGUILA, J.; GARCIA, S. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. 2. Evaluation of antifungal activity of seven American plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v.40, p.207-213, 1993.

CALDERÓN, A.I.; VÁZQUEZ, Y.; SOLÍS, P.N; CABALLERO-GEORGE, C.; ZACCHINO, S.; GIMENEZ, A.; PINZÓN, R.; CÁCERES, A.; TAMAYO, G.; CORRÊA, M.; GUPTA, M.P. Screening of Latin American plants for cytotoxic activity. *Pharmaceutical Biology*, v.44, n.2, p.130-140, 2006.

CALORE, E.E.; CAVALIERI, M.J.; HARAGUCHI, M.; GÓRNIK, S.L.; DAGLI, M.L.Z.; RASPATINI, P.C.F.; CALORE, N.M.P. Experimental mitochondrial myopathy induced by chronic intoxication by *Senna occidentalis* seeds. **Journal of the Neurological Sciences**, v.146, n.1, p.1-6, 1997.

CALORE, E.E.; WEG, R.; HARAGUCHI, M.; CALORE, N.M.P.; CAVALIERI, M.J.; SESSO, A. Mitochondrial metabolism impairment in muscle fibers of rats chronically intoxicated with *Senna occidentalis* seeds. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v.52, n.4, p.357-363, 2000.

CARVALHO, A.A.T.; SAMPAIO, M.C.C.; SAMPAIO, F.C.; MELO, A.F.M.; SENA, K.X.F.R.; CHIAPPETA, A.A.; HIGINO, J.S. Atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos hidroalcoólicos de *Psidium guajava* L. sobre bactérias Gram-negativas. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v.21, n.4, p.255-258, 2002.

CASTELL, J.V.; GÓMEZ-LÉCHON, M.J. The *in vitro* evaluation of the potential risk of hepatotoxicity of drugs. In: _____. **In vitro alternatives to animal pharmacotoxicology**. Barcelona: Farmaindustria, 1992. p.179-204.

CASTELL, J.V.; GÓMEZ-LÉCHON, M.J.; PONSODA, X.; BORT, R. *In vitro* investigation of the molecular mechanisms of hepatotoxicity. In: CASTELL, J.V.; GÓMEZ-LÉCHON, M.J. **In vitro methods in pharmaceutical research**. London: Academic Press, 1997. p.375-410.

CAVADA, B.S.; BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; GRANGEIRO, T.B.; BARRAL-NETTO, M. Revisiting *proteus*: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of *Diocleinae* subtribe lectins. **Current Protein and Peptide Science**, v.2, n.2, p.123-135, 2001.

CESTARI, T.; ABDALLA, C.; SPADAFORA, G.; BEDRAN, J.; FILGUEIRA, A. Antralina: visão atual de uma droga antiga. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.66, p.9-14, 1991.

CHAKRABARTI, A.; NAVAK, N.; TALWAR, P. In vitro proteinases production by *Candida* species. **Mycopathologia**, v.114, n.163-168, 1991.

CHANDRASEKAR, D.; MADHUSUDHANA, K.; RAMAKRISHNA, S.; DIWAN, P.V. Determination of DPPH free radical scavenging activity by reversed-phase HPLC: a sensitive screening method for polyherbal formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.40, n.2, p.460-464, 2006.

CHANDRASEKARAN, M.; VENKATESALU, V. Antibacterial and antifungal activity of *Syzygium jambolanum* seeds. **Journal of Ethnopharmacology**, v.91, p.105-108, 2004.

CHATTOPADHYAY, D.; MAITI, K.; KUNDU, A.P.; CHAKRABORTY, M.S.; BHADRA, R.; MANDAL, S.C.; MANDAL, A.B. Antimicrobial activity of *Alstonia macrophylla*: a folklore of bay islands. ***Journal of Ethnopharmacology***, v.77, p.49-55, 2001.

CHATTOTADHYAY, D.; ARUNACHALAM, G.; MANDAL, A.B.; SUR, T.K.; MANDAL, S.C.; BHATTACHARYA, S.K. Antimicrobial and anti-inflammatory activity of folklore: *Mallotus peltatus* leaf extract. ***Journal of Ethnopharmacology***, v.82, p.229-237, 2002.

CHEESEMAN, K.H.; SLATTER, T.F. **Radicais livres em medicina**. Rio de Janeiro: Interlivros, 1996. 251p.

CHOMNAWANG, M.T.; SURASSMO, S.; NUKOOLKARN, V.S.; GRITSANAPAN, W. Antimicrobial effects of Thai medicinal plants against acne-inducing bacteria. ***Journal of Ethnopharmacology***, v.101, p.330-333, 2005.

CHOPRA, R.N., NAYAR, S.L., AND CHOPRA, I.C. (1956). *Glossary of Indian Medicinal Plants*. Vol.1, p.196. CSIR, New Delhi. *apud* JAIN, S.C.; SHARMA, R.A.; JAIN, R.; MITTAL, C. Antimicrobial screening of *Cassia occidentalis* L. *in vivo* and *in vitro*. ***Phytotherapy Research***, v.12, p.200-204, 1998.

CHUKWUJEKWU, J.C.; COOMBES, P.H.; MULHOLLAND, D.A.; VAN STADEN, J. Emodin, an antibacterial anthraquinone from the roots of *Cassia occidentalis*. ***South African Journal of Botany***, v.72, p.295-297, 2006.

COELHO DE SOUZA, G.; HAAS, A.P.S.; POSER, G.L.; SCHAPOVAL, E.E.S.; ELISABETSKY, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. ***Journal of Ethnopharmacology***, v.90, p.135-143, 2004.

COIMBRA, R. **Notas de fitoterapia**. 2.ed. Rio de Janeiro: Laboratório Clínico Silva Araújo, 1958. p.193.

COLLINS, C.H. Antimicrobial susceptibility tests. In: _____. **Microbiological methods**. 7.ed. Oxford: Butterworth-Hunemann, 1995. p.178-205.

COLVIN, B.M.; HARRISON, L.R.; SANGSTER, L.; GROSSER, H.S. *Cassia occidentalis* toxicosis in growing pigs. ***Journal of the American Veterinary Medical Association***, v.189, n.4, p.423-426, 1986.

COOKSON, A.; MORGAN, A. Contamination of deionized water. ***Drug and Cosmetic Industry***, v.111, n.1/3, p.34-35, 154-156, 1972.

CORDENUNSI, B.R.; NASCIMENTO, J.R.O.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Influence of cultivar on quality parameters and chemical composition of strawberry fruits grown in Brazil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.50, n.9, p.2581-2586, 2002.

CORRÊA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1926. v.3, p.55-57.

CORTEZ, D.A.G.; ABREU FILHO, B.A.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Antibacterial activity of a biphenyl and xanthenes from *Kielmeyera coriacea*. *Pharmaceutical Biology (Lisse, Netherlands)*, v.40, n.7, p.485-489, 2002.

COSMETIC, TOILETRY, AND FRAGRANCE ASSOCIATION. **CTFA Microbiology Guidelines**. Washington: CTFA, 2001.

COWAN, M.M. Plant Products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, v.12, n.4, p.564-582, 1999.

DENNIS, P.A. Herbal medicine among the Miskito of Eastern Nicaragua. *Economic Botany*, v.42, n.1, p.16-28, 1988.

DEUTSCHER, M.P. **Guide to protein purification: methods in enzymology**. San Diego: Academic Press, 1990. v.182, 894p.

DI STASI, L.C.; SANTOS, E.M.G.; SANTOS, D.M.; HIRUMA, C.A. **Plantas medicinais na Amazônia**. São Paulo: Universidade Estadual Paulista, 1989. 194p.

DOLLAHITE, J.W.; HENSON, J.B. Toxic plants as the etiologic agent of myopathies in animals. *American Journal of Veterinary Research*, v.26, p.749-752, 1965.

DOMÍGUEZ, M.; NIETO, A.; MARIN, J.C.; KECK, A.; JEFFERY, E.; CÉSPEDES, C.L. Antioxidant activities of extracts from *Barkleyanthus salicifolius* (Asteraceae) and *Penstemon gentianoides* (Scrophulariaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.53, n.15, p.5889-5895, 2005.

DORMAN, H.J.D.; FIGUEIREDO, A.C.; BARROSO, J.G.; DEANS, S.G. *In vitro* evaluation of antioxidant activity of essential oils and their components. *Flavour and Fragrance Journal*, v.15, n.1, p.12-16, 2000.

DOYLE, A.; GRIFFITHS, J.B. *In vitro* toxicity testing. In: _____. **Cell and tissue culture for medical research**. Chichester: Wiley, 2000. cap.5, p.402-423.

DOYLE, J.J. Phylogeny of the legume family: an approach to understanding the origins of nodulation. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.25, p.325-349, 1994.

DUARTE-ALMEIDA, J.M.; SANTOS, R.J.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema beta-caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.2, p.446-452, 2006.

DUKE, J.A. **Handbook of phytochemical constituents of GRAS herbs and other economic plants**. Boca Raton: CRC Press, 1992a. 654p.

DUKE, J.A. **Handbook of biologically active phytochemicals and their activities**. Boca Raton: CRC Press, 1992b. 183p.

DUPONT, S.; CAFFIN, N.; BHANDARI, B.; DYKES, G. *In vitro* antibacterial activity os Australian native herb extracts against food-related bacteria. **Food and Control**, v.17, n.11, p.929-932, 2006.

DURÁN, R.M.; PADILLA, R.B. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. **Grasas y Aceites**, v.44, n.2, p.101-106, 1993.

DWECK, A.C. Natural preservatives. **Cosmetic and Toiletries**, v.118, n.8, p.45-50, 2003.

DWEK, R.A.; BUTTERS, T.D. Introduction: glycobiology – undertanding the language and meaning of carbohydrates. **Chemica Reviews**, v.102, n.2, p.283-284, 2002.

EKANAYAKE, P.; LEE, Y.D.; LEE, J. Antioxidant activity of flesh and skin of *Eptatretus burgeri* (hag fish) and *Enedrias nebulosus* (White spotted eel). **Food Science and Technology International**, v.10, n.3, p.171-177, 2003.

ELLOF, J.N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**, v.64, n.8, p.711-713, 1998.

ELSNER, P., MAIBACH, H.I., 2000. Cosmeceuticals: Drugs vs. Cosmetics. Marcel Dekker, New York, USA. *apud* PIERONI, A.; QUAVE, C.L.; VILLANELLI, M.L.; MANGINO, P.; SABBATINI, G.; SANTINI, L.; BOCCHETTI, T.; PROFILI, M.; CICCIOLO, T.; RAMPA, L.G.; ANTONINI, G.; GIROLAMINI, C.; CECCHI, M.; TOMASI, M. Ethnopharmacognostic survey on the natural ingredients used in folk cosmetics, cosmeceuticals and remedies for healing skin diseases in the inland Marches, Central-Eastern Italy. ***Journal of Ethnopharmacology***, v.91, p.331-344, 2004.

ELUJOBA, A.A.; AJULO, O.O.; IWEIBO, G.O. Chemical and biological analyses of Nigerian *Cassia* species for laxative activity. ***Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis***, v.7, n.12, p.1453-1457, 1989.

ESPÍN, J.C.; SOLER-RIVAS, C.; WICHES, H.J. Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetables oils and oil fractions using 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, v.48, n.3, p.648-656, 2000.

ETKIN, N.L., 1996. Medicinal cuisines: diet and ethnopharmacology. *International Journal of Pharmacognosy* 34, 313-326. *apud* PIERONI, A.; QUAVE, C.L.; VILLANELLI, M.L.; MANGINO, P.; SABBATINI, G.; SANTINI, L.; BOCCHETTI, T.; PROFILI, M.; CICCIOLO, T.; RAMPA, L.G.; ANTONINI, G.; GIROLAMINI, C.; CECCHI, M.; TOMASI, M. Ethnopharmacognostic survey on the natural ingredients used in folk cosmetics, cosmeceuticals and remedies for healing skin diseases in the inland Marches, Central-Eastern Italy. ***Journal of Ethnopharmacology***, v.91, p.331-344, 2004.

EVANS, C.E.; BANSO, O.A.; SAMUEL, A. Efficacy of some nupe medicinal plants against *Salmonella typhi*: an *in vitro* study. ***Journal of Ethnopharmacology***, v.80, p.21-24, 2002.

FALKENBERG, M.B. Quinonas. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. ***Farmacognosia: da planta ao medicamento***. 5.ed. Porto Alegre: UFRGS, 2004. cap.25, p.657-683.

FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. 2. ed. São Paulo: Siqueira, 1959. p.446-451.

FAZ, E.M.; GOICOCHEA, B.C.; RUANO, M.P. *Cassia occidentalis* toxicosis in heifers. ***Veterinary and Human Toxicology***, v.40, n.5, p.307, 1998.

FENG, P.C.; HAYNES, L.J.; MAGNUS, K.E.; PLIMMER JR., S.H.S. Pharmacological screening of some West Indian medicinal plants. ***Journal of Pharmacy and Pharmacology***, v.14, p.556-561, 1962.

FENNEMA, O.R. **Química de los alimentos**. 2.ed. Zaragoza: Acribia, 1993. 1094p.

FENNER, R.; BETTI, A.H.; MENTZ, L.A.; RATES, S.M.K. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, p.369-394, 2006.

FERESIN, G.E.; TAPIA, A.; LÓPEZ S.N.; ZACCHINO, S.A. Antimicrobial activity of plants used in traditional medicine on San Juan province, Argentine. **Journal of Ethnopharmacology**, v.78, p.103-107, 2001.

FLORY, W.; SPAINHOUR, G.B.J.; COLVIN, B.; HEBERT, C.D. The toxicologic investigation of a feed grain contaminated with seeds of the plant species *Cassia*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.4, n.1, p.65-69, 1992.

FRANÇA, S.B.; PINTO, F.C.R.; LOMBARDO, M.; IKUNO, A.A.; KIYOTA, S.; FERREIRA, V.C.A. Efeito imunomodulador de extrato protéico de *Senna occidentalis* na resposta imune de camundongos Balb/C. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS, BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS, 3, São Paulo, 2005. **Livro de resumos**. São Paulo: Arquivos do Instituto Biológico, 2005. v.72, p.37.

FRESHNEY, R.I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique**. 4.ed. New York: Wiley, 2000. 577p.

GAIND, K.N.; BUDHIRAJA, R.D.; KAUL, R.N. Antibiotic activity of *Cassia occidentalis* Linn. **Indian Journal of Pharmacy**, v.28, n.9, p.248-250, 1966.

GASQUET, M.; DELMAS, F.; TIMON-DAVID, P.; KEITA, A.; GUINDO, M.; KOETA, M.; DIALLO, D.; DOUMO, O. Evaluation *in vitro* and *in vivo* of a traditional antimalarial, "Malarial 5". **Fitoterapia**, v.64, n.5, p.423-426, 1993.

GEORGETTI, S.R.; CASAGRANDE, R.; DI MAMBRO, V.M.; AUZZOLINI, A.; FONSECA, M. Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by chemiluminescence method. **AAPS PharmSci**, v.5, n.2, p.210-214, 2003.

GHOLIZADEH, A.; KUMAR, M.; BALASUBRAHMANYAM, A.; SHARMA, S.; NARWAL, S.; LODHA, M.L.; KAPOOR, H.C. Antioxidant activity of antiviral proteins from *Celosia cristata*. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v.13, p.13-18, 2004.

GINDE, B.S.; HOSANGADI, B.D.; KUDAV, N.A.; NAYAK, K.V.; KULKARNI, A.B. Chemical investigations on *Cassia occidentalis*. I. Isolation and structure of cassiollin, a new xanthone. **Journal of the Chemical Society Section C: Organic**, n.9, p.1285-1289, 1970.

GONZALES, E.; BUTOLO, J.E.; SILVA, R.D.M.; PACKER, U.I.; SILVA, J.M.L. Toxicidade de sementes de fedegoso (*Cassia occidentalis* L.) para frangos de corte. **Scientia Agrícola**, v.51, n.1, p.169-174, 1994.

GRAZIANO, M.J.; FLORY, W.; SEGER, C.L.; HEBERT, C.D. Effects of a *Cassia occidentalis* extract in the domestic chicken (*Gallus domesticus*). **American Journal of Veterinary Research**, v.44, n.7, p.1238-1244, 1983.

GRIPPA, E.; PAVONE, F.; GATTO, M.T.; PETRUCCI, R.; MARROSU, G.; SILVESTRI, B.; SASO, L. In vitro evaluation of antioxidant activity by electrophoresis and high performance liquid chromatography. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1524, n.2/3, p.171-177, 2000.

GROOT, A.C.; BRUYNZEEL, D.P.; BOS, J.D.; VAN der MEEREN, H.L.; VAN JOOST, T.; JAGTMAN, B.A.; WEYLAND, J.W. The allergens in cosmetics. **Archives of Dermatology**, v.124, n.10, p.1525-1529.

GROTH, D.; BOARETTO, M.R.; SILVA, R.N. Morfologia de sementes, frutos e plantas invasoras em algumas culturas. **Revista Brasileira de Sementes**, v.5; n.3; p.151-182, 1983.

GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre: UFRGS, 2004. cap.1, p.13-28.

GUPTA, S.; SHARMA, P.; SONI, P.L. Chemical modification of *Cassia occidentalis* seed gum: carbamoylethylation. **Carbohydrate Polymers**, v.59, p.501-506, 2005.

GURGEL, C.B.F.M. A fitoterapia indígena no Brasil colonial. 2004. Disponível em: www.rj.anpuh.org/Anais/2004/Simposios%20Tematicos/Cristina%20Brandt%20Friedrich%20Martin%20Gurgel.doc. Acesso em: 18 ago.2008.

HAMILL, F.A.; APIO, S.; MUBIRU, N.K.; MOSANGO, M.; BUKENYA-ZIRABA, R.; MAGANYI, O.W.; SOEJARTO, D.D. Traditional herbal drugs of southern Uganda Part III: Isolation and methods for physical characterization of bioactive alkanols from *Rubus apetalus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.87, p.15-19, 2003.

HARAGUCHI, M.; CALORE, E.E.; DAGLI, M.L.Z.; CAVALIERE, M.J.; CALORE, N.M.P.; WEG, R.; RASPANTINI, P.C.F.; GÓRNIK, S.L. Muscle atrophy induced in broiler chicks by parts of *Senna occidentalis* seeds. **Veterinary Research Communications**, v.22, n.4, p.265-271, 1998.

HATANO, T.; MIZUTA, S.; ITO, H.; YOSHIDA, T. C-glycosidic flavonóides from *Cassia occidentalis*. **Phytochemistry**, v.52, p.265-271, 1999.

HEBERT, C.D.; FLORY, W.; SEGER, C.; BLANCHARD, R.E. Preliminary isolation of a myodegeneration toxic principle from *Cassia occidentalis*. **American Journal of Veterinary Research**, v.44, n.7, p.1370-1374, 1983.

HENSON, J.B.; DOLLAHITE, J.W.; BRIDGES, C.H.; RAO, R.R. Myodegeneration in cattle grazing *Cassia* species. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.147, n.2, p.142-145, 1965.

HENSON, J.B.; DOLLAHITE, J.W. Toxic myodegeneration in calves produced by experimental *Cassia occidentalis* intoxication. **American Journal of Veterinary Research**, v.27, p.947-949, 1966.

HERAS, B.; SLOWING, K.; BENEDÍ, J.; CARRETERO, E.; ORTEGA, T.; TOLEDO, C.; BERMEJO, P.; IGLESIAS, I.; ABAD, M.J.; GÓMEZ-SERRANILLOS, P.; LISO, P.A.; VILLAR, A.; CHIRIBOGA, X. Antiinflammatory and antioxidant activity of plants used in traditional medicine in Ecuador. **Journal of Ethnopharmacology**, v.61, p.161-166, 1998.

HUEZA, I.M.; LATORRE, A.O.; RASPANTINI, P.C.F.; RASPANTINI, L.E.R.; MARIANO-SOUZA, D.P.; GUERRA, J.L.; GÓRNIK, S.L. Effect of *Senna occidentalis* in broiler chickens. **Journal of Veterinary Medicine-Series A**, v.54, n.4, p.179-185, 2007.

HUSSAIN, H.S.N.; DEENI, Y.Y. Plants in kano ethnomedicine: screening for antimicrobial activity and alkaloids. **International Journal of Pharmacognosy**, v.29, n.1, p.51-56, 1991.

IBARRA, F.; JOHNSON, C.H. Natural preservation from concepts in nature. **Cosmetics and Toiletries**, v.123, n.3, p.81-90, 2008.

IRIGOYEN, L.F.; GRAÇA, D.L.; BARROS, C.S.L. Intoxicação experimental por *Cassia occidentalis* (Leg. Caes.) em eqüinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.11, p. 35-44, 1991.

IROBI, O.N.; ADEDAYO, O. Antifungal activity of aqueous extract of dormant fruits of *Hyphaene thebaica* (Palmae). **Pharmaceutical Biology**, v.37, n.2, p.114-117, 1999.

JAFRI, M.A.; SUBHANI, M.J.; JAVED, K.; SINGH, S. Hepatoprotective activity of leaves of *Cassia occidentalis* against paracetamol and ethyl alcohol intoxication in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.66, n.3, p.355-361, 1999.

JAIN, S.C.; SHARMA, R.A.; JAIN, R.; MITTAL, C. Antimicrobial screening of *Cassia occidentalis* L. *in vivo* and *in vitro*. **Phytotherapy Research**, v.12, p.200-204, 1998.

JAPANESE Pharmacopoeia. 14.ed. 2001. Disponível em: http://jpd.b.nihs.go.jp/jp14e/14data/General_Test/Microbial_Assay_for_Antibio.pdf. Acesso em: 19 ago.2008

JARDIM, M.A.G.; MENDONÇA, L.F.R.; FERREIRA, M.M.D. Os produtos naturais para o desenvolvimento sustentável e biotecnológico: um estudo sobre plantas antimaláricas no Estado do Pará. **Revista Saber**, v.3, n. esp., p.167-185, 2001.

JEEVAN RAM, A.; BHAKSHU, L.Md.; VENKATA RAJU, R.R. *In vitro* antimicrobial activity of certain medicinal plants from Eastern Ghats, India, used for skin diseases. **Journal of Ethnopharmacology**, v.90, n.2/3, p.353-357, 2004.

JETTY, A.; IYENGAR, D.S. Antimicrobial activity of *Millingtonia hortensis* leaf extract. **Pharmaceutical Biology**, v.38, n.2, p.157-160, 2000.

KALLINGS, L.O.; RINGERTZ, L.; SILVERSTOLPE, L.; ERNERFELDT, F. Microbiological contamination of medical preparations. **Acta Pharmaceutica Suecica**, v.3, n.3, p.219-228, 1966.

KARAMAN, İ.; ŞAHİN, F.; GÜLLÜCE, M.; ÖĞÜTÇÜ, H.; ŞENGÜL, M.; ADIGÜZEL, A. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v.85, p.231-235, 2003.

KATİYAR, S.K.; NIRANJAN, G.S. Studies on carbohydrates and amino acids of some non-cultivated leguminous seeds. **Journal of the Indian Chemical Society**, v.58, n.1, p.98-100, 1981.

KEAN, E.A.; GUTMAN, M.; SINGER, T.P. Studies on the respiratory chain-linked nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase. XXII. Rhein, a competitive inhibitor of the dehydrogenase. **Journal of Biological Chemistry**, v.246, n.8, p.2346-2353, 1971.

KEETON, A.; MURDOK, E.C.; STAPLETON, G.S.; TOLER, J.E. Chemical control systems for coffee *Senna* (*Cassia occidentalis*) in cotton (*Gossypium hirsutum*). **Weed Technology**, v.10, p.550-555, 1996.

KENNEDY, J.F.; PALVA, P.M.G.; CAVALCANTI, M.S.M.; COLEHO, L.C.B.B. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrates Polymers**, v.26, p.219-230, 1995.

KHAN, Z.K.; KATIYAR, R. Potent antifungal activity of garlic (*Allium sativum*) against experimental murine disseminated cryptococcosis. ***Pharmaceutical Biology***, v.38, n.2, p.87-100, 2000.

KIM, H.L.; CAMP, B.J.; GRIGSBY, R.D. Isolation of N-methylmorpholine from the seeds of *Cassia occidentalis* (coffee Senna). ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, v.19, n.1, p.198-199, 1971.

KITANAKA, S.; TAKIDO, M. Two new bitetrahydroanthracenes from roots of *Cassia occidentalis* L. ***Chemical and Pharmaceutical Bulletin***, v.37, n.2, p.511-512, 1989.

KOLEVA, I.I.; VAN BEEK, T.A.; LINSEN, J.P.F.; GROOT, A.; EVSTATIEVA, L.N. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. ***Phytochemical Analysis***, v.13, n.1, p.8-17, 2002.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, W.C. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 5.ed. Rio de Janeiro: Médica e Científica, 2001. 1465p.

KOO, H.M.; SUHAILA, M. Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin and apigenin) content of edible tropical plants. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, v.49, n.6, p.3106-3112, 2001.

KUMAR, S.; BAGCHI, G.D.; DAROKAR, M.P. Antibacterial activity observed in the seeds of some coprophilous plants. ***International Journal of Pharmacognosy***, v.35, n.3, p.179-184, 1997.

KUO S.C.; CHEN, S.C.; LA, C.F.; TENG, C.M.; WANG, J.P. Studies on the antiinflammatory and antiplatelet activities of constituents isolated from the roots and stems of *C. occidentalis* L. ***Chinese Pharmaceutical Journal***, v.48, n.4, p.291-302, 1996.

LACHMAN-WHITE, D.A.; ADAMS, C.D.; O'D TROTZ, U. ***A guide to the medicinal plants of coastal Guyana***. Londres: Commonwealth Secretariat, 1992. p.58.

LAL, J.; GUPTA, P.C. Anthraquinone glycoside from the seeds of *Cassia occidentalis* Linn. ***Cellular and Molecular Life Sciences***, v.29, n.2, p.141-142, 1973.

LEHNINGER, A.L. As lectinas são proteínas específicas capazes de se ligar e aglutinar células. In: _____. **Princípios de bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1991. cap.12, p.239.

LI-CHANG, L.; YUE-WEN, C.; CHENG-CHUN, C. Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food and Drug Microbiology**, v.102, p.213-220, 2005.

LIENARD, V.; SECK, D.; LOGNAY, G.; GASPAR, C.; SEVERIN, M. Biological activity of *Cassia occidentalis* L. against *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Stored Products Research**, v.29, n.4, p.311-318, 1993.

LIENER, I.E. Implication of antinutritional components in soybean foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.1, n.2, p.303-307, 1972.

LOMBARDO, M.; ROSITO, F.M.; CARVALHO, L.R.; KIYOTA, S. Otimização de protocolos de cromatografia líquida de alta eficiência para análise e purificação de proteínas e toxinas peptídicas extraídas de materiais vegetais e de algas cianofíceas. **Arquivos do Instituto Biológico**. v.70, supl.3, p.99-104, 2003.

LOMBARDO, M.; IKUNO, A.A.; BALDASSI, L.; FERREIRA, V.C.A.; KIYOTA, S. Evaluation of protein fractions from *Senna occidentalis* seeds extracts for cytotoxic, antiviral and antibacterial activities. **Virus Reviews and Research**, v.9, n.2, p.61-68, 2004a.

LOMBARDO, M.; IKUNO, A.A.; FERREIRA, V.C.A.; KIYOTA, S. Cytotoxicity and antiviral activities of protein or peptide toxins present in the purification products of active protein fraction from *Senna occidentalis* seeds extracts. **Arquivos do Instituto Biológico**. v.71, supl.1, p.466-469, 2004b.

LOPES, P.S. **Avaliação da eficácia e segurança da papaína como promotor de absorção cutâneo utilizando técnicas biofísicas e cultura celular de queratinócitos humanos**. São Paulo, 2003. 215p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 1991. 440p.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 512p.

LORIS, R.; HAMELRYCK, T.; BOUCKAERT, J.; WYNS, L. Legume lectin structure. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1383, p.9-36, 1998.

LORIS, R. Principles of structures of animal and plant lectins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1572, p.198-208, 2002.

MACDONALD-WICKS, L.K.; WOOD, L.G.; GARG, M.L. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity *in vitro*: a review. ***Journal of the Science of Food and Agriculture***, v.86, p.2046-2056, 2006.

MACGOWAN, A.P.; WISE, R. Establishing MIC breakpoints and the interpretation of *in vitro* susceptibility tests. ***Journal of Antimicrobial Chemotherapy***, v.48, supl.1, p.17-28, 2001.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Brock biology of microorganisms**. 9.ed. New Jersey: Prentice Hall International, 2000. 986p.

MAJMUDAR, G.; SMITH, M. *In vitro* screening techniques in dermatology. ***Cosmetic and Toiletries***, v.113, p.69-76, 1998.

MARCONDES, E.M.C. **Sistemas e qualidade sanitária de águas utilizadas na produção de cosméticos e formulações magistrais**. São Paulo, 2002. 201p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

MARTIN, B.W.; TERRY, M.K.; BRIDGES, C.H.; BAILEY, E.M.J. Toxicity of *Cassia occidentalis* in the horse. ***Veterinary and Human Toxicology***, v.23, n.6, p.416-417, 1981.

MARTINS, E.; MARTINS, V.M.V.; RIETCORRÊA, F.; SONCINI, R.A.; PARABONI, S.V. *Cassia occidentalis* poisoning in swine. ***Pesquisa Veterinária Brasileira***, v.6, n.2, p.35-38, 1986.

MEDOUA, G.N.; MBOFUNG, C.M.F. Kinetics studies of some physicochemical substances during roasting and preparation of beverage made by *Cassia occidentalis* seeds. ***LWT Food Science and Technology***, v.40, n.4, p.730-736, 2006.

MEHMOOD, Z.; AHMAD, I.; MOHAMMAD, F.; AHMAD, S. Indian medicinal plants: a potential source for anticandidal drugs. ***Pharmaceutical Biology***, v.37, n.3, p.237-242, 1999.

MELLO, L.D.; KUBOTA, L.T. Biosensors as a tool for the antioxidant status evaluation. ***Talanta***, v.72, n.2, p.335-348, 2007.

MENSOR, L.L.; MENEZES, F.S.; LEITÃO, G.G.; REIS, A.S.; SANTOS, T.C.; COUBE, C.S.; LEITÃO, S.G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. ***Phytotherapy Research***, v.15, p.127-130, 2001.

MERCER, H.D.; NEAL, F.C.; HIMES, J.A. *Cassia occidentalis* toxicosis in cattle. ***Journal of the American Veterinary Medical Association***, v.151, p.735-741, 1967.

MILARDOVIC, S.; IVEKOVIC, D.; GRABARIC, B.S. A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical. ***Bioelectrochemistry***, v.68, n.2, p.175-180, 2006.

MILLIKAN, L.E., 2001. Cosmetology, cosmetics, cosmeceuticals: definitions and regulations. *Clinics in Dermatology* 19, 371-374. *apud* PIERONI, A.; QUAVE, C.L.; VILLANELLI, M.L.; MANGINO, P.; SABBATINI, G.; SANTINI, L.; BOCCETTI, T.; PROFILI, M.; CICCIOI, T.; RAMPA, L.G.; ANTONINI, G.; GIROLAMINI, C.; CECCHI, M.; TOMASI, M. Ethnopharmacognostic survey on the natural ingredients used in folk cosmetics, cosmeceuticals and remedies for healing skin diseases in the inland Marches, Central-Eastern Italy. ***Journal of Ethnopharmacology***, v.91, p.331-344, 2004.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. ***Songklanakarin Journal of Science Technology***, v.26, n.2, p.211-219, 2004.

MOODY, J.O.; ADEBIYI, O.A.; ADENIYI, B.A. Do *Aloe vera* and *Ageratum conyzoides* enhance the anti-microbial activity of traditional medicinal soft soaps (Osedudu)? ***Journal of Ethnopharmacology***, v.92, p.57-60, 2004.

MORRIS, J.B. Legume genetic resources with novel "value added" industrial and pharmaceutical use. In: JANICK, J., ed. ***Perspectives on new crops and new uses***. Alexandria: ASHS Press, 1999. 528p.

MOUSSU, R: L'intoxication par les graines de *Cassia occidentalis* L. est due a une toxalbumine. ***Comptes Rendus de la Société de Biologie (Paris)***, v.92, p.862-863, 1925.

MUYIBI, S.A.; OLORODE, B.R.; ONYEYILI, P.A.; OSUNKWO, U.A.; MUHAMMAD, B.Y.; AJAGBONNA, O.P. Haematological and histopathological changes of *Cassia occidentalis* leaf extract in rats. ***Nigerian Journal of Natural Products and Medicine***, v.4, p.48-51, 2000.

NADKARNI, A. K., AND NADKARNI, K. M. (1954). *Indian Materia Medica*, 2. Popular Book Depot, Bmbay. *apud* JAIN, S.C.; SHARMA, R.A.; JAIN; R.; MITTAL, C. Antimicrobial screening of *Cassia occidentalis* L. *in vivo* and *in vitro*. ***Phytotherapy Research***, v.12, p.200-204, 1998.

NAGARAJU, N.; RAO, K.N. A survey of plant crude drugs of Rayalaseema, Andhra, Pradesh, India. ***Journal of Ethnopharmacology***, v.29, p.137-158, 1990.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. **Guidance document on using *in vitro* data to estimate *in vivo* starting doses for acute toxicity**: recommendations from an International Workshop organized by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods and the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods. 2001. Disponível em: <http://www.epa.gov/hpv/pubs/general/nih2001b.pdf>. Acesso em: 9 mar. 2008.

NIRANJAN, G.S.; GUPTA, P.C. Chemical constituents of the flowers of *Cassia occidentalis*. ***Planta Medica***, v.23, n.3, p.298-300, 1973.

NOELLI, F.S. Múltiplos usos de espécies vegetais pela farmacologia guarani através de informações históricas. ***Diálogos***, v.2, p.177-199, 1998.

OGUNKUNLE, A.T.J.; LADEJOBI, T.A. Ethnobotanical and phytochemical studies on some species of *Senna* in Nigeria. ***African Journal of Biotechnology***, v.5, n.21, p.2020-2023, 2006.

O'HARA, P.J.; PIERCE, K.R.; READ, W.K. Degenerative myopathy associated with ingestion of *Cassia occidentalis* L: clinical and pathology features of the experimentally induced disease. ***American Journal of Veterinary Research***, v.30, p.2173-2180, 1969.

O'HARA, P.J.; PIERCE, K.R. A toxic cardiomyopathy caused by *Cassia occidentalis*. II. Biochemical studies in poisoned rabbits. ***Veterinary Pathology***, v.11, n.2, p.110-124, 1974.

OKEKE, M.I.; IROEGBU, C.U.; EZE, E.N.; OKOLI, A.S.; ESIMONE, C.O. Evaluation of extracts of the root of *Landolphia owerrience* for antibacterial activity. ***Journal of Ethnopharmacology***, v.78, p.119-127, 2001.

OKOLI, A.S.; IROEGBU, C.U. Evaluation of extracts of *Anthocleista djalensis*, *Nauclea latifolia* and *Uvaria afzalli* for activity against bacterial isolates from cases of non-gonococcal urethritis. ***Journal of Ethnopharmacology***, v.92, p.135-144, 2004.

OLADUNMOYE, M.K.; ADETUYI, F.C.; AKINYOSOYE, F.A. Release of sodium and potassium ions by aqueous and ethanolic extract of *Cassia occidentalis* on some selected bacteria. ***Trends in Applied Sciences Research***, v.2, n.1, p.33-35, 2007.

OLIVER-BEVER, B. Medicinal plants in tropical West Africa III. Anti-infection therapy with higher plants. ***Journal of Ethnopharmacology***, v.9, p.1-83, 1983.

O'NEILL, M.J.; LEWIS, J.A. The renaissance of plant research in the pharmaceutical industry. In: KINGHORN, A.D.; BALLANDRIN, M.F., eds. **Human medicinal agents from plants**. Washington: ACS, 1993. p.48-55. (American Chemical Society Symposium Series, 534).

OSAMU, H.; MASAKO, T.; KAZUYO, H.; SAORI, K. Evaluation of antioxidant activity by chemiluminescence. **Analytical Biochemistry**, v.247, n.2, p.237-241, 1997.

OSTROSKY, E.A.; LIMA, M.E.L.; MIZUMOTO, M.K.; KANEKO, T.M.; FREITAS, B.R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [No prelo].

OU, B.; HUANG, D.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J.A.; DEEMER, E.K. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.11, p.3122-3128, 2002.

OZYURT, D.; DEMIRATA, B.; APAK, R. Determination of total antioxidant capacity by a new spectrophotometric method based on Ce (IV) reducing capacity measurement. **Talanta**, v.71, n.3, p.1155-1165, 2007.

PALSSON, K.; JAENSON, T.G.T. Plant products used as mosquito repellents in Guinea Bissau, West África. **Acta Tropica**, v.72, p.39-52, 1999.

PANDEY, D.K.; TRIPATHI, N.N.; TRIPATHI, R.D.; DIXIT, S.N. Antifungal activity of some seed extracts with special reference to that *Pimpinella diversifolia* D.C. **International Journal of Crude Drug Research**, v.21, n.4, p.177-182, 1983.

PENNA, C.; MARINO, S.; VIVOT, E.; CRUAÑES, M.C.; MUÑOZ, J.D.; CRUAÑES, J.; FERRARO, G.; GUTKIND, G.; MARTINO, V. Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.77, p.37-40, 2001.

PEREZ, C.; ANESINI C. *In vitro* antibacterial activity of Argentine folk medicinal plants against *Salmonella typhi*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.44, p.41-46, 1994.

PETER, W.; DEOGRACIOUS, O. The *in vitro* ascaricidal activity of selected indigenous medicinal plants used in ethno veterinary practices in Uganda. **African Journal of Traditional: Complementary and Alternative Medicines**, v.3, n.2, p.94-103, 2006.

PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiology*, v.109, n.2, p.347-352, 1995.

PHONGPAICHIT, S.; PUJENJOB, N.; RUKACHAISIRIKUL, V.; ONGSAKUL, M. Antifungal activity from leaf extracts of *Cassia alata* L., *Cassia fistula* L., *Cassia tora* L. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, v.26, n.6, p.741-748, 2004.

PIERCE, K.R.; O'HARA, P.J. Toxic myopathy in Texas cattle (*Cassia occidentalis* poisoning). *Southwestern Veterinarian*, v.20, p.179-183, 1967.

PINTO, F.C.R.; LOMBARDO, M.; MARTINS, A.M.C.R.P.F.; FERREIRA, V.C.A.; RICHARDSON, M.; BEMQUERER, M.P.; KIYOTA, S. Hemagglutinating proteins in toxic extracts of *Senna occidentalis* seeds. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 34, Águas de Lindóia, 2005. Livro de resumos. São Paulo: SBBq, 2005. Disponível em: <http://sbbq.iq.usp.br/arquivos/2005/cdlivro/resumos/R020422.pdf>. Acesso em: 18 ago.2008.

PINTO, L.S.; ANDRADE NETO, M.; BACARIN, M.A.; CASTELLÓN, R.R.; GADELHA, T.S.; GADELHA, C.A; CAVADA, B.S. Caracterização química e bioquímica de sementes de *Bauhinia variegata* L. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.9, n.3, p.385-390, 2005.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; OHARA, M.T. Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2003. 261p.

POKORNÝ, J. Natural antioxidants for food use. *Trend in Food Science and Technology*, v.2, n.9, p.223-227, 1991.

PRISTA, L.V.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R.M. Técnica farmacêutica e farmácia galênica. 3.ed. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 1983. v.1, p.403-405.

PROMEGA. Cell Titer 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay. Technical Bulletin nº.169, 2001. Disponível em: <http://www.promega.com/tbs/tb169/tb169.pdf>. Acesso em: 13 abr. 2008.

PURWAR, C.; RAI, R.; SRIVASTANA, N.; SINGH, J. New flavonoid glycosides from *Cassia occidentalis*. *Indian Journal of Chemistry Section B: organic chemistry including medicinal chemistry*, v.42, n.2, p.434-436, 2003.

QUADRY, J.S.; ZAFAR, R. Tissue culture of some *Cassia* species. ***Planta Medica***, v.33, p.299, 1978.

QUIGNARD, E.L.; POHLIT, A.M.; NUNOMURA, S.M.; PINTO, A.C.S.; SANTOS, E.V.M.; MORAIS, K.R.; ALECRIM, A.M.; PEDROSO, A.C.S.; CYRINO, B.R.B.; MELO, C.S.; FINNEY, E.K.; GOMES, E.O.; SOUZA, K.S.; OLIVEIRA, L.C.P.; DON, L.C.; SILVA, L.F.R.; QUEIROZ, M.M.A.; HENRIQUE, M.C.; SANTOS, M.; PINTO, P.S.; SILVA, S.G. Screening of plants found in Amazonas state for lethality towards brine shrimp. ***Acta Amazônica***, v.33, n.1, p.93-104, 2003.

RABANAL, R.M.; ARIAS, A.; PRADO, B.; HERNÁNDEZ-PÉREZ, M.; SÁNCHEZ-MATEO, C.C. Antimicrobial studies on three species of *Hypericum* from the Canary Islands. ***Journal of Ethnopharmacology***, v.81, p.287-292, 2002.

RABIJNS, A.; VERBOVEN, C.; VAN DAMME, E.J.; PEUMANS, W.J.; DE RANTER, C.J. A legume in two crystal forms: preliminary diffraction analysis. ***Acta Crystallographica Section D: biological crystallography***, v.56, p.1638-1640, 2000.

RAHMAN, M.M.; POLFREMAN, D.; MACGEACHAN, J.; GRAY, A. Antimicrobial activities of *Barringtonia acutangula*. ***Phytotherapy Research***, v.19, n.6, p.929-932, 2005.

RAHUA, J.; REMES, S.; HINONEN, M.; HOPIA, A.; KÄHKÖNNEN, M.; KUJALA, T.; PIHLOJA, K.; VUORELA, P. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. ***International Journal of Food Microbiology***, v.56, p.3-12, 2000.

RAI, P.P.; SHOK, M. Anthraquinone glycosides from plant parts of *Cassia occidentalis*. ***Indian Journal of Pharmaceutical Sciences***, v.45, n.2, p.87-88, 1983.

RAJANI, M.; SAXENA, N.; RAVISHANKARA, M.N.; DESAI, N.; PADH, H. Evaluation of the antimicrobial activity of ammoniacum gum from *Dorema ammoniacum*. ***Pharmaceutical Biology***, v.40, n.7, p.534-541, 2002.

REDDY, V.; UROOJ, A.; KUMAR, A. Evaluation of antioxidant activity of some plant extracts and their application in biscuits. ***Food Chemistry***, v.90, n.1/2, p.317-321, 2005.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. ***Free Radical Biology and Medicine***, v.20, n.7, p.933-956, 1996.

RINI, J.M. Lectin structure. *Annual Reviews of Biophysics and Biomolecular Structure*, v.34, p.551-577, 1995.

RIZVI, S.A.; LAL, J.; GUPTA, P.C. Examination of a phytosterolin and a sterol from *Cassia* plants. *Phytochemistry*, v.10, p.670, 1971.

RODRIGUES, E. Plants of restricted use indicated by three cultures in Brazil (Caboclo-river dweller, Indian and Quilombola). *Journal of Ethnopharmacology*, v.111, n.2, p.295-302, 2007.

ROGERS, R.J.; GIBSON, J.; REICHMANN, K.G. The toxicity of *Cassia occidentalis* for cattle. *Australian Veterinary Journal*, v.55, n.9, 408-412, 1979.

ROVER JR., L.; HÖEHR, N.F.; VELLASCO, A.P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Química Nova*, v.24, n.1, p.112-119, 2001.

SADIQUE, J.; CHANDRA, T.; THENMOZHI, V.; ELANGO, V. Biochemical modes of action of *Cassia occidentalis* and *Cardiospermum halicacabum* in inflammation. *Journal of Ethnopharmacology*, v.19, n.2, p. 201-212, 1987.

SAHM, D.F.; WASHINGTON II, J.A. Antibacterial susceptibility tests: dilution methods. In: BALOWS, A.; HAUSER, W.J.; HERMANN, K.L.; ISENBERG, H.D.; SHAMODY, H.J., eds. *Manual of clinical microbiology*. 5.ed. Washington: American Society for Microbiology, 1991. cap.110, p.1105-1115.

SAMA, S.K.; KRISHNAMURTHY, L.; RAMACHANDRAN, K.; LAL, K. Efficacy of an indigenous compound preparation (LIV-52) in acute viral hepatitis-A double blind study. *Indian Journal of Medical Research*, v.64, p.738, 1976.

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

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J.A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.76, n.2, p.270-276, 1998.

SANTOS, A.C.O.; PEIXOTO, C.A.; COELHO, L.C.B.B. Ultrastructural analysis and immunocytochemical localization of isolectins in *Cratylia mollis* seeds. *Micron*, v.35, n.7, p. 613-618, 2004.

SARAF, S.; DIXIT, V.K.; TRIPATHI, S.C.; PATNAIK, G.K. Antihepatotoxic activity of *Cassia occidentalis*. **International Journal of Pharmacognosy**, v.32, n.2, p.178-183, 1994.

SCAZZOCCHIO, F.; COMETA, M.F.; TOMASSINI, L.; PALMERY, M. Antibacterial activity of *Hydrastis Canadensis* extract and its major isolated alkaloids. **Planta medica**, v.67, p.561-564, 2001.

SHELLER, S.; WILCZOK, T.; IMIELSKI, S.; KROL, W.; GRABYS, J.; SHANI, J. Free radical scavenging by ethanol extract of propolis. **International Journal of Radiation Biology**, v.57, n.3, p.461-465, 1990.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; ARIAS, A.R. A screening method for natural products on triatomine bugs. **Phytotherapy Research**, v.6, n.2, p.68-73, 1992.

SCHMITZ, D.G.; DENTON, J.W. Senna bean toxicity in cattle. **Southwestern Veterinarian**, v.30, p.165-170, 1977.

SCHULTES, R.E. 1978. The kingdom plants, p. 208. In: W. A .R. Thomson (cd.), Medicines from the Earth. McGraw-Hill Book Co., New York, N.Y. *apud* COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.4, p.564-582, 1999.

SEIYAKU, K.K.M. Cosmetic composition with whitening and anti-oxidant properties – comprises solvent extract of *Cassia* e.g. *C. Tora* L., *C. Obtusifolia* Vahl, *C. occidentalis* L. JP Pat. 06087731-A, 29 mar. 1994. *apud* SENS, S.L. **Alternativas para a auto-sustentabilidade dos Xokleng da Terra indígena Ibirama**. Florianópolis, 2002. 387p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Engenharia – Universidade Federal de Santa Catarina. Disponível em: <http://teses.eps.ufsc.br/defesa/pdf/7695.pdf>. Acesso em: 9 jan. 2007.

SELLAPPAN, S.; AKOH, C.C.; KREWER, G. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.8, p.2432-2438, 2002.

SEMPLE, S.J.; PYKE, S.M.; REYNOLDS, G.D.; FLOWER, R.L. *In vitro* antiviral activity of the anthraquinone chrysophanic acid against poliovirus. **Antiviral Research**, v.49, n.3, p.169-178, 2001.

SENS, S.L. **Alternativas para a auto-sustentabilidade dos Xokleng da Terra indígena Ibirama**. Florianópolis, 2002. 387p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Engenharia – Universidade Federal de Santa Catarina. Disponível em: <http://teses.eps.ufsc.br/defesa/pdf/7695.pdf>. Acesso em: 9 jan. 2007.

SETHI, J.P.; SHARMA, M. Clinical management of severe acute hepatic failure with special reference to LIV-52 in therapy. 1978. Disponível em: <http://liv52.com/liv235.pdf>. Acesso em: 14 jan. 2007.

SHAH, C.S.; SHINDE, M.V. Phytochemical studies of seeds of *Cassia tora* L. and *C. occidentalis* L. **Indian Journal of Pharmacology**, v.32, p.70, 1969.

SHARIFIFAR, F.; MOSHAFI, M.H.; MANSOURI, S.H.; KHODASHENAS, M.; KHOSHNOODI, M. *In vitro* evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. **Food Control**, v.18, p.800–805, 2007.

SHARMA, N.; TRIKHA, P.; ATHAR, M.; RAISUDDIN, S. Protective effect of *Cassia occidentalis* extract on chemical-induced chromosomal aberrations in mice. **Drug Chemistry and Toxicology**, v.22, n.4, p.643–653, 1999.

SHARMA, N.; TRIKHA, P.; ATHAR, M.; RAISUDDIN, S. *In vitro* inhibition of carcinogen-induced mutagenicity by *Cassia occidentalis* and *Embllica officinalis*. **Drug Chemistry and Toxicology**, v.23, n.3, p.477–484, 2000.

SHARON, N. AND I. OFEK 1986. Mannose specific bacterial surface lectins, p. 55-82. In: D. Mirelman (ed.), Microbial lectins and agglutinins. John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y. *apud* COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.4, p.564–582, 1999.

SHARON, N.; LIS, H. **Lectins**. 2.ed. Heidelberg: Springer, 2004. 470p.

SHRIMALI, M.; JAIN, D.C.; DAROKAR, M.P.; SHARMA, R.P. Antibacterial activity of *Ailanthus excelsa* (Roxb). **Phytotherapy research**, v.15, p.165–166, 2001.

SHUNYING, Z.; YANG, Y.; HUAIDONG, Y.; YUE, Y.; GUOLIN, Z. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Chrysanthemum indicum*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.96, p.151–158, 2005.

SILVA, C.G.; HERDEIRO, R.S.; MATHIAS, C.J.; PANEK, A.D.; SILVEIRA, C.S.; RODRIGUES, V.P.; RENNÓ, M.N.; FALCÃO, D.Q.; CERQUEIRA, D.M.; MINTO, A.B.M.; NOGUEIRA, F.L.P.; QUARESMA, C.H.; SILVA, J.F.M.; MENEZES, F.S.; ELEUTHERIO, E.C.A. Evaluation of antioxidant activity of Brazilian plants. **Pharmacological Research**, v.52, n.3, p.229–233, 2005.

SILVA, R.A.D. **Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil**. 1. ed. São Paulo: Nacional, 1929. p.421 e 462.

SILVA, T.C.; GÓRNIK, S.L.; OLORIS, S.C.S.; RASPANTINI, P.C.; HAGARUCHI, M.; DAGLI, M.L.Z. Effects of *Senna occidentalis* on chick bursa of Fabricius. **Avian Pathology**, v.32, n.6, p.633-637, 2003.

SIMÃO, A.M. **Aditivos para alimentos sob o aspecto toxicológico**. 2.ed. São Paulo: Nobel, 1986. 276p.

SIMIĆ, A.; SOKOVIĆ, M.; RISTIĆ, M.; GRUJIC-JOVANOVIĆ, S.; VUKOJEVIĆ, J.; MARIN, P. The chemical composition of some *Lauraceae* essential oils and their antifungal activities. **Phytotherapy Research**, v.18, p.713-717, 2004.

SIMPSON, C.F.; DAMRON, B.L.; HARMS, R.H. Toxic myopathy of chickens fed *Cassia occidentalis* seed. **Avian Diseases**, v.15, n.2, p.284-290, 1971.

SINGH, M.; SINGH, J. Two flavonoid glycosides from *Cassia occidentalis* pods. **Planta Medica**, v.6, p.525-526, 1985.

SINGH, R.; JAIN, A.; PANWAR, S.; GUPTA, D.; KHARE, K. Antimicrobial activity of some natural dyes. **Dyes and Pigments**, v.66, p.99-102, 2005.

SLUIS, A.A.; DEKKER, M.; JAGER, A.; JONGEN, W.M.F. Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: effect of cultivar, harvest year and storage conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n.8, p.3606-3613, 2001.

SOEJARTO, D.D. Biodiversity prospecting and benefit sharing: perspectives from the field. **Journal of Ethnopharmacology**, v.51, p.1-15, 1996.

SOMOGYI, A.; ROSTA, K.; PUSZTAI, P.; TULASSAY, Z.; NAGY, G. Antioxidant measurements. **Physiological Measurement**, v.28, p.41-55, 2007.

SPEERT, D.P. Understanding *Burkholderia cepacia*: epidemiology, genomics, and virulence. **Infections in Medicine**, v.18, n.1, p.49-56, 2001.

SPELLER, D.C.E.; STEPHENS, M.E.; VINT, A.C. Hospital infection by *Pseudomonas cepacia*. **Lancet**, v.1, n.7703, p.798-799, 1971.

SPRINGFIELD, E.P.; AMABEOKU, G.; WEITZ, F.; MABUSELA, W.; JOHNSON, Q. An assessment of two *Carpobrotus* species extracts as potential antimicrobial agents. **Phytomedicine**, v.10, p.434-439, 2003.

SUBBARAO, V.V.; GUPTA, M.L. Changes in serum transaminases due to hepatotoxicity and the role of an indigenous hepatotonic Liv. 52. 1976. Disponível em: <http://liv52.com/research/liv067.pdf>. Acesso em: 14 jan. 2007.

SUFFREDINI, I.; SADER, H.; GONÇALVES, A.; REIS, A.; GALES, A.; VARELLA, A.; YOUNES, R. Screening of antibacterial extracts from plants native to the Brazilian Amazon Rain Forest and Atlantic Forest. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.37, p.375-384, 2004.

SULIMAN, H.B.; SHOMMEIN, A.M. Toxic effect of the roasted and unroasted beans of *Cassia occidentalis* in goats. **Veterinary and Human Toxicology**, v.28, n.1, p.6-11, 1986.

SUTTON, S. Measurement of cell concentration in suspension by optical density. **Pharmaceutical Microbiology Forum Newsletter**, v.12, n.8, p.3-13, 2006.

SWANSTON-FLATT, S.K.; DAY, C.; BAILEY, C.J.; FLATT, P.R. Evaluation of traditional plant treatments for diabetes: studies in streptozotocin diabetic mice. **Acta Diabetologica**, v.26, n.1, p.51-55, 1989.

TADEG, H.; MOHAMMED, E.; ASRES, K.; GEBRE-MARIAN, T. Antimicrobial activities of some selected traditional Ethiopian medicinal plants used in treatment of skin disorders. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p.168-175, 2005.

TAMMARO, F., XEPAPADAKIS, G., 1986. Plants used in phytotherapy, cosmetics and dyeing in the Pramanda District (Epirus, Northwest Greece). *Journal of Ethnopharmacology* 16, 167-174. *apud* PIERONI, A.; QUAVE, C.L.; VILLANELLI, M.L.; MANGINO, P.; SABBATINI, G.; SANTINI, L.; BOCCETTI, T.; PROFILI, M.; CICCIOI, T.; RAMPA, L.G.; ANTONINI, G.; GIROLAMINI, C.; CECCHI, M.; TOMASI, M. Ethnopharmacognostic survey on the natural ingredients used in folk cosmetics, cosmeceuticals and remedies for healing skin diseases in the inland Marches, Central-Eastern Italy. **Journal of Ethnopharmacology**, v.91, p.331-344, 2004.

TASAKA, A.C.; WEG, R.; CALORE, E.E.; SINHORINI, I.L.; DAGLI, M.L.Z.; HARAGUCHI, M.; GÓRNIK, S.L. Toxicity testing of *Senna occidentalis* seed in rabbits. **Veterinary Research Communications**, v.24, n.8, p.573-582, 2000.

TASKOVA, R.; MITOVA, M.; MIKHOVA, B.; DUDDECK, H. Bioactive phenolics from *Carthamus lanatus* L. **Zeitschrift für Naturforschung C: Journal of Biosciences**, v.58, p.704-707, 2003.

TEEN, D.H.; HOVELAN, C.S.; BUCHAN, G.A. Sicklepod (*Cassia obtusifolia*) and coffee *Senna* (*Cassia occidentalis*): geographic distribution, germination and emergence (infestation survey in southeastern US). **Weed Science**, v.28, p.68-71, 1980.

TESKE, M.; TRENTINI, A.M.M. **Compêndio de fitoterapia**. Curitiba: Laboratório Botânico, 1994. p.98.

THORNSBERRY, C. Antimicrobial susceptibility testing: general considerations. In: BALOWS, A.; HAUSER, W.J.; HERMANN, K.L.; ISENBERG, H.D.; SHAMODY, H.J., eds. **Manual of clinical microbiology**. 5.ed. Washington: American Society for Microbiology, 1991. cap.107, p.1059.

TIWARI, R.D.; SINGH, J. Flavonoids from the leaves of *Cassia occidentalis*. **Phytochemistry**, v.16, p.1107-1108, 1977.

TONA, L.; NGIMBI, N.P.; TSAKALA, M.; MESIA, K.; CIMANGA, R.K.; APERS, S.; DE BRUYNE, T.; PIETERS, L.; TOTTE, J.; VLIETINCK, A.J. Antimalarial activity of 20 crude extracts from nine African medicinal plants used in Kinshasa, Congo. **Journal of Ethnopharmacology**, v.68, n.1/3, p.193-203, 1999.

TONA, L.; MESIA, K.; NGIMBI, N.P.; CHRIMWAMI OKOND'AHONKA, B.; CIMANGA, R.K.; DE BRUYNE, T.; APERS, S.; HERNANS, N.; TOTTE, J.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A.J. *In-vivo* antimalarial activity of *Cassia occidentalis*, *Morinda morindoides* and *Phyllanthus niruri*. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.95, n.1, p.47-57, 2001.

TONA, L.; CIMANGA, R.K.; MESIA, K.; MUSUAMBA, C.T.; DE BRUYNE, T.; APERS, S.; HERNANS, N.; VAN MIERT, S.; PIETERS, L.; TOTTE, J.; VLIETINCK, A.J. *In vitro* antiplasmodial activity of extracts and fractions from seven medicinal plants used in the Democratic Republic of Congo. **Journal of Ethnopharmacology**, v.93, n.3, p.27-32, 2004.

TRUEBA, G.P.; SANCHEZ, G.M. Los flavonóides como antioxidantes naturales. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v.20, p.297-306, 2001.

TSHINBANGU, J.; CHIFUNDERA, K.; KAMISKY, R.; WRIGHT, A.; KÖNIG, G. Screening of African medicinal plants for antimicrobial and enzyme inhibitory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.80, p.25-35, 2002.

UNITED States Pharmacopoeia. 28.ed. Easton: Mack Printing, 2005. p.2242-2243.

VASHISHTHA, V.M.; KUMAR, A.; JOHN, T.J.; NAYAK, N.C. *Cassia occidentalis* poisoning as the probable cause of hepatomyoencephalopathy in children in western Uttar Pradesh. **Indian Journal of Medical Research**, v.125, p.756-762, 2007.

VELLOSA, J.C.R.; BARBOSA, V.F.; OLIVEIRA, O.M.M.P. Pesquisa de produtos naturais: plantas e radicais livres. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.IV, n.2, p.119-130, 2007. Disponível em: <http://www.revistas.ufg.br/index.php/REF/article/view/3026/3048>. Acesso em: 15 jan. 2008.

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

VIEGUERAS, A.I., PORTILLO, L., 2001. Uses of *Opuntia* species and the potential impact of *Cactoblastis cactorum* (Lepidoptera: Pyralidae), Mexico Florida Entomologist 84, 493-498. *apud* PIERONI, A.; QUAVE, C.L.; VILLANELLI, M.L.; MANGINO, P.; SABBATINI, G.; SANTINI, L.; BOCCETTI, T.; PROFILI, M.; CICCIOI, T.; RAMPA, L.G.; ANTONINI, G.; GIROLAMINI, C.; CECCHI, M.; TOMASI, M. Ethnopharmacognostic survey on the natural ingredients used in folk cosmetics, cosmeceuticals and remedies for healing skin diseases in the inland Marches, Central-Eastern Italy. **Journal of Ethnopharmacology**, v.91, p.331-344, 2004.

VIETMEYER, N.D. Lesser-known plants of potential use in agriculture and forestry. **Science**, v.232, p.1379-1384, 1986.

VINSON, J.A.; SU, X.; ZUBIK, L.; BOSE, P. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n.11, p.5315-5321, 2001.

VORAVUTHIKUNCHAI, S.; LORTHEERANUWAT, A.; JEEJU, W.; SRIRIRAK, T.; PHONGPAICHIT, S.; SUPAWITA, T. Effective medicinal plants against enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.94, p.49-54, 2004.

ZARDO, V.; MEZZARI, A. Os antifúngicos nas infecções por *Candida sp*. **NewsLab**, v. 63, p.136-146, 2004.

ZGODA, J.R.; PORTER, J.R. A convenient microdilution method for screening natural products against bacteria and fungi. **Pharmaceutical Biology**, v.39, n.3, p.221-225, 2001.

ZHANG, Y.; LEWIS, K. Fabatins: new antimicrobial plant peptides. **FEMS Microbiology Letters**, v.149, p.59-64, 1997.

ZHENG, W.; WANG, S.Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, v.49, n.11, p.5165-5170, 2001.

ZUANAZZI, J.A.S.; MONTANHA, J.A. Flavonóides. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre: UFRGS, 2004. cap.23, p.577-614.

YEN, G.C.; CHEN, H.W.; DUH, P.D. Extraction and identification of an antioxidative component from jue ming zi (*Cassia tora* L.). ***Journal of Agriculture and Food Chemistry***, v.46, p.820-824, 1998.

YILDIRIM, A.; MAVI, A.; KARA, A.A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, v.49, n.8, p.4083-4089, 2001.

YU, L.; HALEY, S.; PRET, J.; HARRIS, M.; WILSON, J.; QIAN, M. Free radical scavenging properties of wheat extracts. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, v.50, n.6, p.1619-1624, 2002.

WADER, G.R.; KUDAV, N.A. Chemical investigation of *Cassia occidentalis* Linn. with special reference to isolation of xanthones from *Cassia* sp. ***Indian Journal of Chemistry Section B: organic chemistry including medicinal chemistry***, v.26, p.703, 1987.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis**. 2.ed. New York: Springer, 1996. 384p.

WANG, S.Y.; ZHENG, W. Effect of plant growth temperature on antioxidant capacity in strawberry. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, v.49, n.10, p.4977-4982, 2001.

WARNANT, P.; MERTENS, P.; MARCHE, C. Screening of poplar biomass for bio-active compounds: a simple method to assess antioxidant activity. ***Bioresource Technology***, v.93, n.1, p.43-48, 2004.

WOLVEN, A.; LEVENSTEIN, I. Cosmetics: contaminated or not. ***Toilet Goods Association, Cosmetic Journal***, v.1, p.34, 1969.

ANEXOS

- Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa;
- Informações para os membros da Banca Julgadora.

SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO BIOLÓGICO

COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CETEA-IB

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 69/08, sobre o Projeto: Avaliação da atividade antimicrobiana e da citotoxicidade de extratos aquosos e hidroalcoólicos de *Senna occidentalis* L. (Link), sob a responsabilidade de Márcia Lombardo está de acordo com os princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Protocolo aprovado pela CETEA-IB em 17 de setembro de 2008.

São Paulo, 17 de setembro de 2008.

Dra. Vera Cecilia Annes Ferrelira

Coordenadora da CETEA-IB

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

05508-900 - Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - São Paulo - Brasil.

São Paulo, 27 de abril de 2006

Ilma. Sra.
Profa. Dra. Vaientina Porta
Coordenadora do CEP/FCF

Prezada Senhora,

Vimos, por meio desta, solicitar a possibilidade de alteração do título do projeto de pesquisa intitulado *Avaliação da atividade antimicrobiana e da citotoxicidade de extratos de folhas de Rubus rosaefolius Sm. visando sua aplicação como conservante em cosméticos* (CEP /FCF/USP nº229) para *Avaliação da atividade antimicrobiana e da citotoxicidade de extratos de vegetais visando a aplicação como conservante*.

Justificamos a solicitação, pois pretendemos estudar os extratos de folhas da *Lippia salviaefolia Cham.* e extratos da semente de *Senna occidentalis* com os mesmos métodos e grupo de pesquisadores envolvidos no referido projeto.

Informamos que estamos enviando, em anexo, o projeto com as modificações pretendidas.

Agradecemos antecipadamente e colocamo-nos à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários.

Atenciosamente,

Prof. Dra. Telma Mary Kaneko

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Ofício CEP nº 32/2008

São Paulo, 04 de abril de 2008.

Ilmo(a). Sr(a).
Profa. Dra. Telma Mary Kaneko
FBF

Prezado(a) Senhor(a).

Vimos informar que o Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 31 de julho de 2006, **APROVOU** a alteração do título do projeto "Avaliação da atividade antimicrobiana e da citotoxicidade de extratos de folhas de *Rubus rosaefolius* Sm. visando sua aplicação como conservante em cosméticos"(P-229) apresentado por Vossa Senhoria, para "**Avaliação da atividade antimicrobiana e da citotoxicidade de extratos vegetais visando sua aplicação como conservantes**"

Atenciosamente,

Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
FCF/USP