

Évaluation de l'activité analgésique de l'extrait aqueux des feuilles de *Cajanus cajan* (Fabaceae)

Kevin Ange Zazou ZOKORE^{1*}, Cyril Guillaume DROUCOULA¹, Landry Sylvain KOUAKOU²,
Gisèle Siransy KOUAKOU² et Francis Adou YAPO¹

¹ Université Félix Houphouët Boigny, UFR Biosciences, Laboratoire de Pharmacodynamie-Biochimique,
BP 582 Abidjan 22, Côte d'Ivoire

² Université Félix Houphouët Boigny, UFR Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Département de
Pharmacologie Clinique et de Pharmacie Thérapeutique, BP 1679 Abidjan 22, Côte d'Ivoire

* Correspondance, courriel : zokorezazou@yahoo.fr

Résumé

L'objectif de cet article est d'évaluer l'activité analgésique de l'extrait aqueux des feuilles de *C. cajan* (fabaceae). L'effet analgésique a été étudié en utilisant le test de contorsion induit par l'acide acétique 1 % et le test d'immersion de la queue chez la souris. Le paracétamol molécule de référence à la dose de 100 mg/kg de poids corporel (pc) et l'extrait aqueux ont été administrés par voie orale. La morphine à la dose de 10 mg/kg de pc a été administrée par voie intrapéritonéale. Les résultats ont montré que l'extrait aux doses de 12,5 ; 25 ; 50 ; 100 et 200 mg/kg de pc présentait des pourcentages d'inhibition respectivement de 90 % ; 88,33 % ; 73,33 % ; 69,19 % et 60,83 % contre 82,50 % pour le paracétamol. Aux temps T₃₀, T₉₀ et T₁₂₀ minutes, l'extrait a prolongé le temps de retrait de la queue de la souris de façon significative (p < 0,001) aux doses 10 ; 12,5 ; et 50 mg/kg de pc. Aux faibles doses l'extrait aqueux des feuilles de *C. cajan* posséderait une activité analgésique. Ainsi *C. cajan* pourrait être une source potentielle pour soulager les douleurs.

Mots-clés : *Cajanus cajan*, analgésique, périphérique, centrale, extrait aqueux.

Abstract

Evaluation of the analgesic activity of the aqueous extract of the leaves of *Cajanus cajan* (Fabaceae)

The objective of this article is to evaluate the analgesic activity of the aqueous extract of leaves of *C. cajan* (fabaceae). The analgesic effect was studied using the 1 % acetic acid-induced writhing test and the tail immersion test in mice. The paracetamol reference molecule at the dose of 100 mg / kg bw and the aqueous extract were administered orally. Morphine at a dose of 10 mg / kg bw was administered intraperitoneally. The results showed that the extract at doses of 12.5; 25; 50; 100 and 200 mg / kg bw showed percentages of inhibition respectively of 90 %; 88.33 %; 73.33%; 69.19 % and 60.83 % against 82.50 % for paracetamol. At times T₃₀, T₉₀ and T₁₂₀ minutes, the extract extended the withdrawal time of the mouse tail significantly (p < 0.001) at doses 10; 12.5; and 50 mg / kg bw. At low doses, the aqueous extract of *C. cajan* leaves has analgesic activity. Thus *C. cajan* could be a potential source for relieving pain.

Keywords : *Cajanus cajan*, analgesic, peripheral, central, aqueous extract.

1. Introduction

La douleur est une manifestation totalement subjective, et sa définition est de ce fait difficile. L'association internationale pour l'étude de la douleur (IASP) a proposé en 1979 la définition suivante : « la douleur est une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable, associée à une lésion tissulaire réelle ou potentielle, ou décrite dans des termes impliquant une telle lésion » [1]. Des médicaments courants pour le soulagement de la douleur contenant le paracétamol ou la morphine ont été largement utilisés au cours des dernières décennies. Dans la plupart des cas les analgésiques, en particulier les opioïdes et les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) ne peuvent soulager que 50 % de la douleur chez environ 30 % des patients [2]. Ces médicaments sont donc devenus un problème majeur dans le monde parce qu'ils entraîneraient des effets secondaires graves. Des études ont montré que les opiacés provoqueraient une dépendance physique, une tolérance alors que les AINS provoqueraient généralement des troubles gastro-intestinaux, une insuffisance rénale, une toxicité hépatique et les maladies cardiovasculaires [3]. Les plantes sont une source importante de médicaments. Bon nombre de médicaments modernes actuellement disponibles ont également été dérivés directement ou indirectement de sources végétales. Les médicaments à base de plantes se sont révélés être des outils de remplacement efficaces, économiques et sûrs pour le traitement et la prévention de diverses maladies humaines avec moins d'effets secondaires en Afrique et dans les pays en développement [4, 5]. *C. cajan* (fabaceae) est une plante qu'on trouve au Nord, au Sud, au Sud-Est de la Côte d'Ivoire. Les feuilles de cette plante sont utilisées traditionnellement pour traiter diverses maladies notamment le paludisme, l'enflure et la douleur, l'anémie, la gingivite, la constipation [6]. Une étude phytochimique des feuilles de *C. cajan* a révélé la présence de stérols et polyterpènes, de polyphénols, de flavonoïdes, de tanins catéchique, de substances quinoniques [7] conférant des propriétés antidiabétique, antioxydante, antivirale, antipaludéenne, hépatoprotectrice aux feuilles de *C. cajan* [8 - 11]. Compte tenu des avantages thérapeutiques de *C. cajan*, la présente étude a été menée pour évaluer l'effet analgésique de l'extrait aqueux des feuilles de *C. cajan*.

2. Matériel et méthodes

2-1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé était constitué de feuilles de *C. cajan*. Ces feuilles ont été récoltées dans la région d'Azaguié dans le département d'Agboville situé au Sud de la Côte d'Ivoire. Cette plante a été identifiée et authentifiée au Centre National de Floristique (CNF) de l'Université Félix Houphouët Boigny.

2-2. Préparation de l'extrait

Les feuilles de *C. cajan* ont été séchées à l'abri du soleil à température ambiante pendant environ 2 semaines puis broyées pour obtenir une poudre de couleur verdâtre. Pour la préparation de l'extrait aqueux, 100 g de poudre de feuilles de *C. cajan* ont été ajoutés à 1 litre d'eau distillée et le mélange a été porté à ébullition pendant vingt minutes (20 min). La décoction a été filtrée deux fois sur du coton blanc et une fois sur du papier filtre Whatman N° 3. Le filtrat a été séché à l'étuve à 40°C durant 4 jours [12].

2-3. Matériel animal

Des souris femelles albinos pesant entre 21 et 30 g ont été utilisées pour l'évaluation de l'activité analgésique. Elles ont été élevées à l'animalerie de l'UFR Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université Félix Houphouët Boigny de Côte d'Ivoire. Ces animaux ont été acclimatés à la température ambiante de 26 ± 1 °C avec une humidité relative de 50 ± 5 % et un cycle de 12 h lumière-obscurité ; puis

ont été placés dans les cages en plastique hygiéniques spacieuses contenant des copeaux au cours de la période expérimentale. Ces souris ont été nourries avec des granulés de la société FACI® (Fabrication d'Aliments Composés Ivoiriens) et buvaient de l'eau du robinet. Dans toutes les études expérimentales, chaque groupe comprenait six animaux. Chaque animal n'a été utilisé qu'une seule fois. L'enquête est conforme à la recommandation de la directive de l'Organisation pour la Coopération Économique et de Développement (OCDE) en 2008 [13]. Avant l'expérience, les souris ont été divisées en lots homogènes selon le poids.

2-4. Méthode d'étude de l'activité analgésique

L'évaluation de l'activité analgésique a pris en compte deux composantes : l'activité analgésique périphérique et l'activité analgésique centrale.

2-4-1. Activité analgésique périphérique : contorsion induite par l'acide acétique

Le test de contorsion induit par l'acide acétique a été réalisé en utilisant la méthode décrite par [14] avec une légère modification. Les souris sont réparties en neuf (9) lots de six (6). Le lot 1 qui a servi de contrôle a reçu de l'eau distillée, le lot 2 a été prétraité avec le paracétamol à la dose de 100 mg/kg de poids corporel. Les lots 3 ; 4 ; 5 ; 6 ; 7 ; 8 et 9 ont reçu l'extrait aqueux respectivement aux doses de 12,5 ; 25 ; 50 ; 100 ; 200 ; 400 et 600 mg/kg de poids corporel. Trente (30) minutes après le prétraitement, les animaux ont reçu par injection intrapéritonéale de l'acide acétique 1 %. Le syndrome douloureux se caractérise par des mouvements d'étirements des pattes postérieures et des torsions de la musculature dorso-abdominale. Les souris ont été placées individuellement dans les cages transparentes et les contorsions ont été comptées pendant vingt (20) minutes à partir de cinq (5) minutes après l'injection de l'acide acétique. Le pourcentage d'inhibition des contractions abdominales a été calculé selon la **Formule** ci-dessous.

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{W_c - W_t}{W_c} * 100 \quad (1)$$

Wt étant le nombre de contorsions dans les lots traités, Wc le nombre de contorsions dans le lot témoin.

2-4-2. Activité analgésique centrale : test d'immersion de la queue

La méthode décrite par [15] a été utilisée pour l'expérience. Cette méthode consiste à tremper la queue de la souris dans de l'eau chaude à 55 ° C et à étudier le réflexe de rétraction de la queue de l'animal, avant et après l'administration des extraits. Il a été établi que le temps normal de rétraction de la queue est de 2 secondes. Avant d'administrer les extraits, la queue de chaque souris a été trempée dans de l'eau chaude. Puis celles dont le temps de retrait de la queue a été inférieur ou égal à 2 secondes ont été retenues pour l'expérience. Celles-ci ont été réparties en dix (10) groupes de six (6) souris. Le groupe 1 a servi de témoin et a reçu de l'eau physiologique (NaCl 0,9 %), le groupe 2 a été prétraité avec la morphine standard à la dose de 10 mg/kg de pc. Les groupes 3 ; 4 ; 5 ; 6 ; 7 ; 8 ; 9 et 10 ont reçu l'extrait aqueux des feuilles de *C. cajan* respectivement aux doses de 10 ; 12,5 ; 25 ; 50 ; 100 ; 200 ; 400 et 600 mg/kg de pc. Deux centimètres (2 cm) de la queue de chaque souris a été trempée dans de l'eau chaude contenue dans un bain-marie réglé à la température de 55 ° C. Le temps entre l'immersion et le retrait de la queue a été enregistré à 30 ; 60 ; 90 et 120 minutes après le traitement par les extraits à l'aide d'un chronomètre numérique. Un temps de coupure de 15 secondes a été maintenu pour éviter les lésions tissulaires de la queue chez les souris.

2-5. Médicaments et produits chimiques

Les médicaments utilisés étaient le paracétamol et la morphine (Sigma, France). Les autres produits chimiques utilisés ont été achetés localement.

2-6. Analyses statistiques

Les données ont été analysées en utilisant une analyse de variance (ANOVA) suivie d'un test de Dunnett à l'aide du logiciel Graph Pad Prism 5.0. Le niveau de significativité a été déterminé en comparaison avec le groupe témoin. Le seuil de significativité a été accepté pour * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

3. Résultats

3-1. Test du writhing

L'effet analgésique de l'extrait aqueux des feuilles de *C. cajan* lors du test de contorsions induit par l'acide acétique est représenté dans le **Tableau 1**. La molécule de référence (paracétamol 100mg/kg de pc) a réduit de façon significative ($p < 0,001$) le nombre de contorsions ($3,5 \pm 2,95$) comparé à celui du témoin ($20 \pm 8,246$) avec un pourcentage d'inhibition de 82,50 %. Les résultats ont montré que l'extrait aqueux a baissé de manière significative ($p < 0,001$; $p < 0,05$) le nombre de contorsions à toutes les doses, exceptée la dose de 600 mg/kg de pc. Les doses de 12,5 et 25 mg/kg de pc de l'extrait ont diminué la douleur de manière très significative avec des pourcentages d'inhibition respectifs 90 % et 88,33 % supérieurs à celui du paracétamol.

3-2. Test d'immersion de la queue

Les effets de l'extrait aqueux des feuilles de *C. cajan* et de la morphine, sur le temps de retrait de la queue sont représentés dans le **Tableau 2**. L'administration de la morphine (10 mg/kg) a augmenté significativement le temps de retrait de la queue de la souris ($p < 0,001$) par rapport au témoin à T_{30} , T_{60} , T_{90} et à T_{120} minutes. L'effet analgésique de l'extrait aqueux des feuilles de *C. cajan* a été observé de manière significative aux doses de 10 à 100 mg/kg de pc par rapport au témoin tandis qu'aux doses de 200 à 600 mg/kg de pc l'effet analgésique n'a pas été significatif. L'extrait aqueux à la dose de 10 mg/kg de pc a augmenté de façon significative ($p < 0,05$; $p < 0,001$) le temps de retrait de la queue da souris par rapport au témoin de T_{60} jusqu'à T_{120} . Puis aux doses 12,5 et 100 mg/kg de pc, la douleur a été réduite de manière significative à T_{90} et T_{120} . L'extrait à la dose de 50 mg/kg de pc a présenté un effet analgésique similaire à la morphine.

Tableau 1 : Effet analgésique de l'extrait aqueux des feuilles de *C. cajan* sur les contractions abdominales induites chez la souris par l'acide acétique

Traitement	Dose mg/kg	Nombre de contorsions	Pourcentage d'inhibition
Contrôle	-	$20 \pm 8,246$	-
EA	12,5	$2,00 \pm 1,673^{***}$	90,00
EA	25	$2,333 \pm 1,633^{***}$	88,33
EA	50	$5,333 \pm 4,082^{***}$	73,33
EA	100	$6,167 \pm 5,037^{***}$	69,16
EA	200	$7,833 \pm 6,145^{***}$	60,83
EA	400	$12,17 \pm 3,545^*$	39,15
EA	600	$13,50 \pm 3,017_{ns}$	32,50
Paracétamol	100	$3,500 \pm 2,950^{***}$	82,50

Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm écart type, $N = 6$ souris, *** $P < 0,001$ et * $P < 0,05$: différence significative par rapport au lot témoin, ns : différence non significative à $P > 0,05$ par rapport au lot témoin ; EA : Extrait Aqueux

Tableau 2 : Effet de l'extrait aqueux des feuilles de *C. cajan* sur le temps de réaction par le test d'immersion de la queue de la souris

	Temps			
	T 30	T 60	T 90	T 120
NaCl	2,906 ± 0,555	3,549 ± 1,800	2,346 ± 0,463	3,454 ± 1,225
EA 10	3,338 ± 1,050 ^{ns}	9,772 ± 3,894*	12,13 ± 2,727***	14,28 ± 1,133***
EA 12,5	5,724 ± 2,993 ^{ns}	8,880 ± 5,703 ^{ns}	11,92 ± 5,062***	13,68 ± 2,952***
EA 25	3,336 ± 1,343 ^{ns}	6,144 ± 5,119 ^{ns}	10,30 ± 2,663**	7,556 ± 2,689 ^{ns}
EA 50	9,218 ± 5,579***	9,800 ± 3,347*	11,97 ± 4,191***	11,56 ± 4,898***
EA 100	3,460 ± 0,909 ^{ns}	5,648 ± 4,195 ^{ns}	8,088 ± 3,382*	10,80 ± 3,677**
EA 200	1,870 ± 0,489 ^{ns}	2,672 ± 0,623 ^{ns}	3,890 ± 1,679 ^{ns}	2,882 ± 2,876 ^{ns}
EA 400	1,050 ± 0,330 ^{ns}	1,788 ± 0,550 ^{ns}	2,598 ± 3,418 ^{ns}	2,882 ± 2,876 ^{ns}
EA 600	1,488 ± 0,405 ^{ns}	1,664 ± 0,917 ^{ns}	1,710 ± 0,729 ^{ns}	2,022 ± 0,315 ^{ns}
Morphine 10	14,49 ± 1,145***	14,44 ± 1,261***	12,97 ± 2,033***	12,40 ± 2,191***

T30, T60, T90 et T120 : immersion de la queue respectivement 30, 60, 90 et 120 min après administration des produits. Les valeurs sont les moyennes accompagnées de l'écart type. Chaque lot comprend 6 animaux (n=6/lot). ***P < 0,001, **P < 0,01, *P < 0,05 : différence significative par rapport au lot témoin, **P < 0,01 : différence significative par rapport au lot témoin, *P < 0,05 : différence significative par rapport au lot témoin, ns : différence non significative à p > 0,05 par rapport au lot témoin EA : fraction aqueuse de *C. cajan*, Morphine : lot traité avec la morphine à la dose de 10 mg/kg pc. EA 10 : lot traité avec EA à la dose de 10 mg/kg de pc, EA 12,5 : lot traité avec EA à la dose de 12,5 mg/kg pc, EA 25 : lot traité avec EA à la dose de 25 mg/kg pc, EA 50 : lot traité avec EA à la dose de 50 mg/kg pc. EA 100 : lot traité avec EA à la dose de 100 mg/kg pc, EA 200 : lot traité avec EA à la dose de 200 mg/kg pc, EA 400 : lot traité avec EA à la dose de 400 mg/kg pc, EA 600 : lot traité avec EA à la dose de 600 mg/kg pc.

4. Discussion

Cette étude a pour but d'étudier l'activité analgésique de l'extrait aqueux des feuilles de *C. cajan*. Pour cela, le writhing test et le test d'immersion de la queue chez la souris ont été utilisés. Le writhing test a été utilisé en raison de sa sensibilité et pour évaluer l'effet analgésique périphérique [16]. L'injection intrapéritonéale de l'acide acétique chez la souris a induit des contorsions abdominales impliquant les récepteurs péritonéaux [17]. En effet la douleur provoquée par l'injection de l'acide acétique est due à la libération des médiateurs chimiques tels que la sérotonine, l'histamine, la bradykinine, les prostaglandines (PGE 2α, PGF 2α) et la substance P [18]. Les prostaglandines sensibilisent donc les neurones nociceptifs périphériques [19]. Dans la présente étude, l'extrait a baissé de manière significative le nombre de contorsions. La molécule de référence (paracétamol 100 mg/kg de pc) a réduit la douleur avec un pourcentage d'inhibition de 82,50 %. L'extrait a diminué la douleur aux doses de 12,5 et 25 mg/kg de pc avec des pourcentages d'inhibition respectifs 90 % et 88,33 % supérieurs à celui du paracétamol. Ces résultats sont supérieurs aux pourcentages d'inhibition obtenus par [17] avec l'extrait aqueux des fruits de *Dichrostachys glomerata* (69,8 %) ; [1] avec l'extrait méthanolique des feuilles de *Syngonium podophyllum* (60 %) ; [18] avec de l'extrait éthanolique de *Daucus carota* (44,44 %). Les substances actives contre la douleur interféraient avec les médiateurs de la douleur ou agiraient sur le système nerveux central (SNC) pour bloquer la transmission du signal douloureux [20]. Le paracétamol empêcherait la production des prostaglandines par inhibition des enzymes cyclo-oxygénases 3 (COX 3) [21]. De plus il augmenterait l'effet des neurones sérotoninergiques. Ces neurones inhibent les voies

de la douleur. En stimulant ces neurones, le paracétamol réduirait donc indirectement la sensation de douleur. Les effets observés dans la présente étude suggèrent que l'extrait aqueux des feuilles de *C. cajan* pourrait soulager la douleur périphérique en inhibant les médiateurs de la douleur. Le test d'immersion de la queue est basé sur l'observation que les composés de type morphinique sont capables de prolonger le temps de retrait de la queue chez la souris [2]. Ce test a été utilisé pour évaluer l'effet analgésique central des feuilles de *C. cajan*. Dans la présente étude, la morphine 10 mg/kg de pc (molécule de référence) a augmenté significativement le temps de retrait de la queue de la souris par rapport au témoin durant tout le temps de l'observation. L'effet analgésique de l'extrait a été observé de manière significative aux doses de 10 à 100 mg/kg de pc par rapport au témoin. L'extrait à la dose de 50 mg/kg de pc a présenté un effet analgésique similaire à la morphine (référence agoniste utilisée). Ces résultats sont meilleurs que ceux de [1] qui ont observé l'effet analgésique à la 180 minutes et ceux de [17] à la 2^e heure. La morphine provoquerait sur les récepteurs opiacés une analgésie spinale ou supra- spinale en réduisant le phénomène de libération des neurotransmetteurs ou en favorisant la libération de la dopamine induisant une sensation d'euphorie [22]. L'extrait aqueux des feuilles de *C. cajan* agirait donc directement au niveau du système nerveux central sur les récepteurs opiacés. Les effets observés dans la présente étude montrent que l'extrait aqueux des feuilles de *C. cajan* posséderait une activité analgésique centrale. Une étude sur la phytochimie des feuilles de *C. cajan* menée par [7] a montré la présence des flavonoïdes, des tanins, des polyphénols, des substances quinoniques, des stérols et polyterpènes, des saponosides. En effet des études ont prouvé que les plantes douées d'activité analgésique, était due aux flavonoïdes, aux tanins, aux polyphénols [23].

5. Conclusion

L'effet analgésique de l'extrait aqueux des feuilles de *C. cajan* a été évalué par le writhing test et le test d'immersion de la queue chez la souris. L'extrait a diminué la douleur aux doses de 12,5 et 25 mg/kg de pc avec des pourcentages d'inhibition respectifs 90 % et 88,33 % supérieurs à celui de la molécule de référence (paracétamol 100 mg/kg). A la dose de 50 mg/kg de pc, l'extrait a montré un effet analgésique similaire à la morphine (10 mg/kg de pc). L'extrait aqueux des feuilles de *C. cajan* posséderait donc une activité analgésique périphérique et centrale. Cela justifierait en partie son utilisation en médecine alternative pour soulager les douleurs.

Remerciements

Les auteurs remercient le Laboratoire de Pharmacologie et le département de chimie analytique, chimie générale et minérale et de bromatologie de l'UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université Felix Houphouët Boigny.

Références

- [1] - M. S. HOSSAIN, M. S. UDDIN, M. T. KABIR, S. AKHTER, S. GOSWAMI, A. AL- MAMUN, O. HERRERA-CALDERON, M. ASADUZZAMAN and M. M. ABDEL-DAIM, *Annual Research & Review in Biology*, 16 (3) (2017) 001 - 012
- [2] - D. B. K. KOUA, E. K. EFFO, L. S. KOUAKOU, C. G. DROUCOULA and F. H. YAPI, *International Journal of Biochemistry Research and Review*, 20 (4) (2017) 001 - 007
- [3] - A. LANAS, *The American journal of the Medical Sciences*, 338 (2) (2009) 096 - 106

- [4] - J. A. SUJI and R. VIMALASTALIN, *International Journal of Research in Biochemistry and Biophysics*, 4 (2) (2014) 013 - 018
- [5] - S. SANGITA, L. SWARN and N. T. KAVINDRA, *Journal of Scientific Research*, 58 (2014) 075 - 085
- [6] - T. RONG, T. RU-HUA, JIA-ZHONG, JUN-HUI, XIAO-LING and H. YING-JIE, *pharmaceutical biology*, 55 (1) (2017) 1740 - 1746
- [7] - K. A. Z. ZOKORE, A. F. YAPO, A. T. OKPEKON, B. A. P. MIEZAN, G. C. DROUCOULA, K. B. D. KOUA et S. G. KOUAKOU, *European Journal of Biotechnology and Bioscience*, 6 (1) (2018) 001 - 005
- [8] - C. E. ADAOBI, A. A. PETER, C. O. CHARLES and B. O. CHINWE, *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*, 1 (2) (2010) 081 - 084
- [9] - U. U. NWODO, A. A. NGENE, C. U. IROEGBU, O. A. L. ONYEDIKACHI, V. N. CHIGOR and A. I. OKOH, *Arch Virol*, 156 (2011) 1551 - 1557
- [10] - L. NAHAR, F. NASRIN, R. ZAHAN, A. HAQUE, E. HAQUE, and A. MOSADDIK, *Pharmacognosy Research*, 6 (2) (2014) 180 - 187
- [11] - B. MAHITHA, P. ARCHANA, M. D. H. EBRAHIMZADEH, K. SRIKANTH, M. RAJINIKANTH and N. RAMASWAMY, *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 77 (2) (2015) 170 - 177
- [12] - R. M. X. DE MOUA, P. S. PEREIRA, A. H. JANUÁRIO, S. C. FRANÇA and D. A. DIAS, *Chem. Pharm. Bull*, 52 (11) (2004) 1342 - 1344
- [13] - R. RODRIGO, D. GIL, M. A. MIRANDA and G. KALANTZIDIS, *Advances in Clinical Chemistry*, 58 (2012) 225 - 254
- [14] - R. KOSTER, M. ANDERSON and E. J. DEBEER, *Fed Proc*, 18 (1959) 412
- [15] - F. E. D'AMOUR and D. L. A. SMITH, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 72 (1) (1941) 074 - 079
- [16] - C. O. UKWUEZE, S. O. ONOJA and M. I. EZEJA, *Journal of Advances in Medical and Pharmaceutical Sciences*, 3 (3) (2015) 131 - 137
- [17] - G. K. A. ATSANG, D. P. D. DZEUFET, S. H. FOYET, T. DIMO and P. KAMTCHOUING *European Journal of Medicinal Plants*, 4 (8) (2014) 964 - 978
- [18] - A. F. OSMAN, N. H. SHAFIK, R. E. SHAFEK and H. N. MICHAEL, *Annual Research and Review in Biology*, 27 (6) (2018) 001 - 007
- [19] - S. O. ONOJA, C. O. UKWUEZE, M. I. EZEJA, N. E. UDEH, *J. Exp. Integr Med.*, 14 (4) (2014) 273 - 277
- [20] - A. O. ANAGA, E. V. ONEHI, *Afr J. Pharm Pharmacol*, 4 (2010) 140 - 4
- [21] - K. T. KHADIZA, N. I. SAYEMAN, S. R. SADIUR, M. A. SABBIR and J. SHARMIN, *Journal of Pharmaceutical Research International*, 20 (2) (2017) 001 - 007
- [22] - M. B. SAMAD, N. M. D'COSTA, A. KABIR and J. M. A. HANNAN, *European Journal of Medicinal Plants*, 3 (1) (2013) 146 - 162
- [23] - S. H. FERREIRA, *International Journal of Clinical Practice Supplement*, 128 (2002) 2 - 10