

Activités antimicrobiennes et antioxydantes des extraits aqueux totaux des feuilles de *Megaphrynium macrostachyum* (Benth.) Milne-Redh. (Marantaceae) et de *Palisota hirsuta* (Thunb.) K. Schum. (Commelinaceae)

U. Maloueki(1,2*), Musuyu M.(3), Mbomba N.B.A.(1,2), Ndimbo K.S.P(2), Kapetshi K.J.(4), Kabena N.O.(1)

Abstract

Antimicrobial and antioxidant activities of total aqueous extracts of *Megaphrynium macrostachyum* (Benth.) Milne-Redh. (Marantaceae) and *Palisota hirsuta* (Thunb.) K. Schum. (Commelinaceae) leaves

Published online:
October 17th 2013

Keywords:

pan paniscus,
Megaphrynium macrostachyum, *Palisota hirsuta*, antimicrobial activity, antioxydant activity

The study of the feedstuffs ecology of some animals suggests a possible use of certain plants for therapeutic purposes. The ethnopharmacological informations from the Téké people and the observations of pygmy chimpanzee's behavioral (*Pan paniscus*), was led by a not-invasive methods, in the forests of Mbou-Mon-Tour (Bolobo), in D.R. Congo. Of the 43 species of food plants collected, consumed by pygmies chimpanzees, only leaves of *Megaphrynium macrostachyum* and *Palisota hirsuta* were studied. The aqueous extracts of these leaves showed the presence of alkaloids, anthocyanins, flavonoids, saponins, and gallic tannins. The bioassays « *in vitro* » antimicrobial activities were carried out by disk diffusion method on Muller-Hinton Agar medium on: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. The extracts of *M. macrostachyum* and *P. hirsuta* showed no inhibitory effect on the micro-organism tested at concentrations of 50 µg and 100 µg. The antioxidant activities were better highlighted by a methanol solution of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH°) 2 % (m/v) on thin layer chromatography (TLC) in mobile phase (ethyl acetate / acetic acid / formic acetic / water ; 100 : 11 : 11 : 27). The antioxidant potential quantification was measured on ELISA reader at concentrations from 1,95 µg.ml⁻¹ to 500 µg.ml⁻¹. The results showed unequivocally that the totals aqueous extracts of *P. hirsuta* and *M. macrostachyum* have significantly reduced the DPPH° radical with IC₅₀ of 6,49 µg.ml⁻¹ and 15,92 µg.ml⁻¹ respectively, determined using the software Origin® version 6.1. The diet of the bonobos, rich in secondary metabolites, can act in a preventive way and/or curative to improve their health and could be used to guide the search for new molecules potentially active in human medicine.

(1) Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université de Kinshasa, B.P. 190, Kinshasa XI, R.D. Congo

(2) Comité Scientifique pour la Recherche, la Conservation et le Développement de la Biodiversité, Université de Kinshasa, B.P. 190, Kinshasa XI, R.D. Congo

(3) Département de Chimie Médicinale et Pharmacognosie, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, Université de Kinshasa, B.P. 212, Kinshasa XI, R.D. Congo

(4) Département de Microbiologie, Cliniques Universitaires de Kinshasa, Faculté de Médecine, Université de Kinshasa, B.P. 834, Kinshasa XI, R.D. Congo

(*)Correspondant : ulrich_0786@yahoo.fr ; Tél. : (+243) 991581045

1. Introduction

Dans le monde, les maladies infectieuses sont responsables de nombreux décès (Orth & Sansonetti, 2006). Elles sont dues à la montée de la pathogénicité des souches *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S.*

aureus et *C. albicans*. Elles sont une conséquence des résistances de médicaments. Elles provoquent un problème récurrent d'émergence et de réémergence. L'incidence de ces maladies est devenue une préoccupation majeure de santé publique.

Par ailleurs, le stress oxydatif causé par les cellules est dû à un apport insuffisant d'antioxydants dans l'alimentation et semblerait jouer un rôle prépondérant dans les phénomènes du vieillissement et engendrerait des pathologies telles que des cancers, des maladies cardiovasculaires et des troubles neurodégénératifs, comme les maladies d'Alzheimer ou de Parkinson. Ainsi donc, l'apport exogène d'antioxydants (alimentation, médicaments, etc.) pourrait donc ralentir, voire prévenir ces désordres physiologiques (Cuendet, 1999 in Cavin, 2007).

Des recherches récentes ont montré que beaucoup d'espèces de primates africains sont des hôtes naturels pour le rétrovirus SIV (Virus d'Immunodéficience Simienne) (Hirsch & Johnson, 1993 in Tutin, 1999), qui conduisent à l'infection de type VIH « Virus d'Immunodéficience Humaine » chez l'homme. L'innocuité du rétrovirus SIV établit aussi chez le Bonobo (Cournaud et al., 2004), suggère une co-évolution entre le Bonobo et le virus dans les forêts tropicales de la R.D. Congo. Il y a lieu de s'interroger s'il existe un rapport entre le comportement, l'écologie et les facteurs démographiques des bonobos pouvant jouer un rôle dans la barrière immunologique.

De nombreuses maladies ne sont pas soignées. Aussi, nous proposons-nous, par observation des grands singes dans leur habitat naturel « *in situ* », les forêts tropicales humides de la R.D. Congo, de rechercher de nouvelles substances naturelles plus actives et moins toxiques dans les plantes que ces animaux utilisent. Les études de Musuyu (2006) ; Fruth et al. (2010) ; Musuyu et al. (2012) en sont un exemple.

Plusieurs chercheurs travaillent depuis quelques décennies sur les comportements d'automédications animales. C'est le cas de Krief (2004) qui a observé quelques patrons de comportements d'automédications chez les chimpanzés de Kanyawara, en Ouganda. Même lorsque les fruits mûrs et riches en sucres sont abondants, les chimpanzés ingèrent des parties végétatives (feuilles, tiges, écorces), riches en métabolites secondaires qui n'ont pas nécessairement une valeur nutritive élevée, mais qui leur assurent une bonne santé. Moins calorique, cette alimentation serait alors curative. Par exemple, le latex de certaines espèces de *Ficus* contient de la ficine, un mélange d'enzymes pouvant lyser les parasites digestifs. Les travaux de Messner & Wrangham, (1996), Huffman (1997), Krief (2003), Krief et al., (2005) en sont

un exemple de l'utilisation des plantes par les primates pour se soulager des maux.

Les tradipraticiens utilisent certaines d'entre elles (pour diverses prescriptions, par exemple les difficultés respiratoires, parasites intestinaux ou cutanés, etc.), et qu'ils se servent à quelques différences près des mêmes organes de la plante que consomment les bonobos.

Des nombreuses études rapportent les vertus en médecine traditionnelle africaine de *P. hirsuta* et seulement une seule indication pour *M. macrostachyum* (Bouquet, 1969 ; Neuwinger, 2000). Ainsi donc, nous chercherons à déterminer les profils phytochimiques des deux plantes consommées par les bonobos, et à mettre en évidence les propriétés pharmacologiques sur des pathogènes pouvant altérer la santé des bonobos (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans*), et sur le potentiel réducteur du radical DPPH°.

2. Matériels et Méthodes

2.1. Site d'étude

Les observations des bonobos se sont déroulées dans la province de Bandundu, en Territoire de Bolobo, secteur de Mbée, District des Plateaux en R.D. Congo. Le type de climat qui a prévalu dans les aires géographiques explorées, selon la classification de Köppen est du type Aw4, climat tropical humide de type soudanien, marqué par l'alternance entre la saison pluvieuse et la saison sèche. Cette dernière ne dure habituellement que 4 mois, à savoir de la mi-mai jusqu'à la mi-septembre.

Le Territoire de Bolobo se situe à 300 km N-O de Kinshasa. Nous avons mené nos investigations dans les localités de Nkala-MMT et Embirima distantes d'environ de près de 11 km, aux coordonnées GPS (Garmin 12CX, France) respectivement de 02°35'307"S, 016°28'237"E et de 02°37'777"S, 016°23'347"E. Les observations ont eu lieu en Septembre 2008. La végétation est constituée d'un ensemble de micro-habitats, entre autres, près des cours d'eau avec un habitat composé d'arbres relativement bas et le sol est boueux ; la forêt primaire avec un sol plus ferme, beaucoup plus sombre, avec de nombreux grands arbres, une canopée élevée et continue et plus denses (jusqu'à plus de 25 m), une végétation au sol éparsée constituée principalement de buissons. Eclaircies à quelques endroits dues à des chutes d'arbres (les chablis), créant des conditions favorables pour une

végétation dense et luxuriante. Cette forêt fournit la majorité de l'alimentation aux Bonobos. Enfin la forêt secondaire : la densité en arbres est plus faible que dans la forêt primaire à cause de l'exploitation par l'homme. Mais on y rencontre une végétation dense au sol (le sous-bois), dominée par des lianes, des Marantaceae (*Megaphrynium spp.*, *Haumania spp.*, etc.). Entrecoupées des habitats de transitions, des savanes herbeuses dominées par des *Panicum spp.*, et une savane arbustive dominée par des *Landolphia spp.*, lesquelles sont traversées par les rivières Lebomo et Mbali.

2.2. Méthodes d'observations comportementales des Bonobos

Les Bonobos sont habituellement suivis de l'aube à la tombée de la nuit, vers 18 heures, le moment où ils construisent leurs nids en formes aplaties. La localisation des nids est alors identifiée précisément, ce qui permet de s'y rendre le lendemain matin, vers 5h20, avant le réveil des bonobos et de les suivre au cours de la journée. Nous avons marché le long des transects, jusque dans les sites de dortoirs ou de nidifications où nous avons pu constater que les nids ont été construits sur les arbres alimentaires (Bonobo Feeding Tree) (Hohmann & Fruth, comm. pers.). Par exemple, sous les dortoirs, nous avons pu remarquer la présence d'urines et crottes laissés à leurs réveils. Outre ces marques, nous avons pu voir les restes de nourriture dans les sous-bois, notamment les coques de fruits, la moelle et la base tendre des jeunes feuilles non encore déployées de plusieurs espèces de Marantaceae (*Megaphrynium spp.*, *Haumania spp.*, *Marantochloa spp.*, *Sarcophrynium spp.*, etc.), constituant une source de nourriture que consomment toute l'année les Bonobos. Dans d'autres cas, nous avons pu observer que les bonobos ont déchiré avec leurs dents les bordures de feuilles ou ont avalé des feuilles entières de certaines des espèces de lianes et d'arbres alimentaires. L'essentiel de leur alimentation est constitué de végétation herbacée terrestre (VHT) (Yamakoshi, 2004). Faute d'habitation effective, nous nous sommes confrontés à de nombreuses difficultés sur le plan des observations directes (déplacements rapides, forêt dense impénétrable, etc.) et nous avons dû perdre la trace des bonobos. Ils pouvaient alors être localisés grâce à leurs vocalisations.

A cet effet, près de 47 échantillons de plantes alimentaires correspondant à 43 espèces végétales ont été récoltées.

2.3. Matériel végétal

Les feuilles de *Megaphrynium macrostachyum* (Benth.) Milne-Redh. (Marantaceae) et de *Palisota hirsuta* (Thunb.) K. Schum. (Commelinaceae) ont été récoltées et identifiées l'herbarium de l'Institut National d'Etudes et de Recherches en Agronomie (Faculté des Sciences, Département de Biologie, Université de Kinshasa, R.D. Congo). Les séchages à l'air libre de plantes ont été parachevés au laboratoire d'Ethnobotanique et Phytochimie de Max-Planck Institute for Evolutionary Anthropology, à Kinshasa, R.D. Congo. Après séchage, les échantillons ont été réduits en poudres à l'aide d'un broyeur électrique (IKA® A11 basic, Allemagne), puis passés au tamis (Retsh®, diamètre de mailles 500 µm, Allemagne) pour l'obtention des poudres fines qui ont servi pour la préparation des extraits aqueux.

Nous avons disposé de poudres des feuilles de *M. macrostachyum* et de *P. hirsuta*. Respectivement 10 g et 12 g de poudres végétales de ces échantillons ont été pesés et introduits chacun dans un bécher contenant 100 ml d'eau distillée. L'ensemble des mélanges a été porté sur la plaque chauffante pour une préalable ébullition pendant 15 minutes. La suspension a été ensuite filtrée à chaud à l'aide d'un entonnoir sur de l'ouate hydrophile, le filtrat obtenu a constitué le décocté.

2.4. Screening phytochimique

L'extraction aqueuse pour le criblage des tests de détection des groupes chimiques a été menée sur les extraits totaux aqueux des poudres végétales obtenues par décoction. Cette préparation a été préférée pour être le plus proche possible des conditions d'utilisation des plantes par les Bonobos et les tradipraticiens. Les réactions de caractérisation qualitative basées sur des réactions de coloration et/ou de précipitation ont été effectuées.

Les alcaloïdes ont été caractérisés à partir des réactifs de Bouchardat (réactif iodo-ioduré), de Dragendorff (réactif à l'iodo-bismuthate de nitrate en milieu acidifié d'acide acétique), de Mayer (réactif à l'iodo-mercurate de potassium) et de Wagner (réactif iodo-ioduré); de façon à éviter des faux positifs. Nous avons disposé de 2,5 ml de filtrats de chaque solution dans lesquels sont ajoutés respectivement 2,5 ml des réactifs de Bouchardat provoquant un précipité ou une coloration brun-noirâtre, de Dragendorff un précipité ou une coloration rouge-orangé, de Mayer un précipité ou une coloration blanc-

jaunâtre et indiquant une réaction positive et de Wagner un précipité brun floconneux.

Pour la recherche des anthocyanes, nous avons versé dans un tube à essais 2,5 ml de l'extrait total aqueux et de l'acide chlorhydrique (HCl) 20 %. L'ensemble du tube est porté à chaud sur une plaque chauffante dans un bain-marie à 90°C pendant 30 minutes. L'apparition d'un précipité ou une coloration rouge-violacé témoigne la présence des anthocyanes.

Pour rechercher les flavonoïdes, nous sommes partis du même procédé décrit précédemment, mais nous nous sommes servis de la soude caustique (NaOH) 10 %. L'ajout de 10 gouttes de NaOH 10 % dans le tube à la température ambiante conduit à un précipité ou une coloration jaune-orangé qui confirme la présence de flavonoïdes.

Les substances quinoniques ont été recherchées à partir du réactif de Borntraeger. Nous avons disposé de 2 ml de chacun des extraits qui ont été évaporés à sec au bain-marie. Le résidu est trituré dans 5 ml de HCl à 37 % à chaud au 1/5. Le triturât est versé dans un tube à essais. Le triturât est porté ensuite au bain-marie pendant 30 minutes. Après refroidissement, il est extrait par 20 ml de chloroforme. L'ammoniaque 10 % (0,5 ml) est ajoutée à la solution chloroformique. Une coloration rouge ou violette révéla la présence des quinones (N'guessan et al., 2009).

La mise en évidence de saponosides a été effectuée par agitation manuelle du tube à essais contenant 2,5 ml de l'extrait total aqueux dans le sens de la longueur du tube pendant 1 minute puis laissé au repos. L'apparition d'une colonne de mousse persistante, d'au moins 1cm de hauteur pendant 15 minutes a indiqué la présence de saponosides (Loubaki et al., 1999).

La réaction à la liqueur de Fehling, le sulfate de cuivre, le sel de Seignette et la soude caustique ont permis de caractériser les sucres réducteurs. A 2,5 ml de l'extrait total aqueux, nous avons ajouté 2,5 ml de la liqueur de Fehling puis porté la solution à chaud sur une plaque chauffante dans un bain-marie à 90°C pendant 30 minutes. L'apparition d'un précipité ou une coloration rouge brique intense a indiqué la présence de sucres réducteurs.

Les tannins catéchique et gallique sont précipités en présence du chlorure ferrique (FeCl₃) 1 %. Nous avons disposé dans le tube à essais 1 ml de l'extrait total aqueux dilué 2 fois, puis ajouté 4 gouttes de FeCl₃ 1 %.

L'observation d'un précipité en gros flocons a caractérisé les tannins catéchiques. Pour les tannins galliques, l'apparition d'un précipité noir intense a révéla la présence de tannins galliques.

Les terpènes et les stéroïdes ont été recherchés par la réaction de Liebermann. Nous avons disposé de 5 ml de l'extrait total aqueux qui a été évaporé sur bain-marie. Le résidu est dissout à chaud dans 1 ml d'anhydride acétique ; nous avons ajouté 0,5 ml d'acide sulfurique concentré au triturât. L'apparition, à l'interphase, d'un anneau pourpre ou violet, virant au bleu puis au vert, a indiqué une réaction positive (N'guessan et al., 2009).

2.5. Rendements d'extraction

Pour avoir les rendements des extractions nous avons pesé 10,44 g de poudre de feuilles de *Megaphrynium macrostachyum* et de *Palisota hirsuta* chacune. Ces poudres ont été dissoutes dans 150 ml d'eau distillée dans un bécher et portées à l'ébullition pendant 15 minutes. Nous avons filtré à chaud la solution au moyen d'un entonnoir sur de l'ouate hydrophile. Cette opération de filtrage a été reprise quatre fois de suite pour chaque solution. De ce fait, nous avons placé les filtrats obtenus de nos différents extraits totaux aqueux au froid, jusqu'à une congélation complète, puis suivis d'une lyophilisation.

2.6. Tests biologiques

Les souches cliniques d'origine bactérienne (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*) et fongique (*Candida albicans*) ont été fournis par le Service de Microbiologie des Cliniques Universitaires de l'Université de Kinshasa. Elles proviennent de produits pathologiques prélevés sur des malades (Tableau 1).

Les diamètres des zones d'inhibition ont été déterminés selon la méthode de diffusion en milieu solide sur milieu gélosé de Müeller-Hinton Agar, telle que décrite par Kirby-Bauer et al., (1966) reprise par Kechkar (2008).

Nous avons utilisé des disques de papier filtre de 6mm de diamètre préalablement imprégnés avec 20µl de décocté de feuilles des extraits de plantes aux concentrations de 50 µg et 100 µg, émulsionnée dans le tween 80 1 %, ont été déposés à la surface d'un milieu solide ensemencé avec une suspension bactérienne ou fongique.

Tableau 1. Identification et origine des souches cliniques

Souches pathogènes	Origine
Bactéries	
<i>Escherichia coli</i> (Gram-négatif)	Urines
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (Gram-négatif)	Urines
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Gram-négatif)	Urines
<i>Staphylococcus aureus</i> (Gram-positif)	Pus
Levure	
<i>Candida albicans</i> (Non filamenteux)	Sécrétions vaginales

En ce qui concerne les diamètres des zones d'inhibition des antibiotiques commerciaux, la même procédure a été utilisée. Les antibiotiques suivants ont été choisis en raison de leur spectre d'action assez large et de leur utilisation fréquente en milieu hospitalier pour le traitement des infections causées par la plupart des germes de l'étude, notamment : Ampicilline (10 µg) (Shalina INJ. B.P. 1 g, Kinshasa, R.D. Congo), Chloramphénicol (30 µg) (North China Pharmaceutical Group Corporation INJ. B.P. 1 g, Chine), Ciprofloxacine (5µg) (Nirma Limited I.V. B.P. 200mg/100 ml, Kinshasa, R.D. Congo), Gentamicine (10 µg) (Shandong Yikang Pharmaceutical INJ. B.P. 80 mg/ 2 ml, Chine), Métronidazole (100 µg) (Nirma Limited I.V. B.P. 500 mg/ 100 ml, Kinshasa, R.D. Congo). Les boîtes de Pétri (Roth, Allemagne) de 60mm de diamètre sont incubées à l'étuve (Jouan, France) à 37 °C pendant 18 à 24 heures pour les bactéries et 36 heures pour la levure.

Après incubation, on mesure les diamètres des éventuelles zones d'inhibition observées autour des disques. Les coefficients d'activité pour les souches bactériennes des zones d'inhibition importantes sont calculés suivant la formule ci-après :

$$A = \frac{a}{q} \quad \text{avec} \quad a = \pi \frac{d^2}{4} \quad (\text{Pibiri, 2006}).$$

Où, A est le coefficient d'activité (en cm²/µg), a est la surface d'inhibition bactéricide (en cm²), q est la quantité de produits actifs (en µg) et d est le diamètre (en mm) d'inhibition mesurable, diamètre du disque imbibé inclus.

Le pourcentage d'inhibition de la levure est calculé selon l'équation suivante (Soliman & Badaea, 2002 in Haddouchi et al., 2009) :

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(D_1 - D_2)}{D_2} \times 100.$$

Où, D₁ est le diamètre (en cm) de la prolifération des levures en absence de produits actifs dans le milieu et D₂

est le diamètre (en cm) de la prolifération des levures en présence de produits actifs dans le milieu.

Pour l'évaluation du potentiel antioxydant du radical stable 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH°), nous avons effectué des mesures qualitatives et quantitatives.

L'évaluation qualitative par chromatographie sur couche mince (CCM), est effectuée selon la méthode de Mensah et al. (2004). Nous avons pesé 1,2 mg et 5,2 mg de poudres de feuilles de *Megaphrynium macrostachyum* et de *Palisota hirsuta* respectivement, émulsionnées dans du méthanol 80 % à 1 mg/ml. Nous avons disposé de 2 plaques chromatographiques en verres de 5 x 10 cm à gel de silice 60 F254 (Merck, Allemagne), sur lesquelles nous avons appliqué en spots 5 µl des extraits à analyser et 2µl de quercétine et d'isoquercétrine. Pour ce test nous avons utilisé différents systèmes de solvants, répartis comme suit :

- 1) La cuve chromatographique n°1: acétate d'éthyle / acide acétique / acide formique / eau (100 : 11 : 11 : 27 ; V / V / V / V), phase mobile polaire.
- 2) La cuve chromatographique n°2 : butanone-2 / toluène (4 : 6 ; V / V), phase mobile moins polaire.

Après développement et séchage des plaques à l'air libre, nous les avons plongées pendant 5 secondes dans une chambre de trempage (Desaga DC-Tauchfix 200, Allemagne) remplie d'une solution méthanolique de DPPH° 2 % (m/v). Nous avons laissé sécher nos plaques à la température ambiante. Les composés à activité antioxydante apparaissent sous formes de taches (spots) jaunes sur fond violet. Les rapports frontaux (Rf) de composés de chacun des extraits sont déterminés à la lumière du visible.

Le test sur microplaque (NuncTM, Danemark) à 96 puits stériles est effectué selon la méthode de Okusa et al., (2007). Nous avons pesé successivement 24mg et 50mg de poudres de feuilles de *Megaphrynium macrostachyum* et de *Palisota hirsuta*, émulsionnée dans le tween 80 1 % (le blanc) à 10,5 µg.ml⁻¹. En plus de nos extraits nous avons disposé de l'acide ascorbique à 15 mg préparé dans les mêmes conditions que décrites précédemment à 0,75 mg/ml. Nous avons procédé de la manière suivante :

Plaques de préparations de la série des dilutions (fond en U).

Mettre 100 µl de tween 80 1 % dans tous les puits excepté ceux de la 2^{ème} colonne où l'on mettra 200µl de solution tween 80 1 % des produits à tester (un extrait dans les 3 premiers puits, l'acide ascorbique dans les 2 puits suivants et un deuxième extrait dans les 3 derniers puits).

Prélever 100µl de solutions à tester dans la 2^{ème} colonne et les mettre dans la colonne suivante, la 3^{ème} et mélanger par aspirations et rejets à l'aide d'une micropipette multicanale. Procéder ainsi jusqu'à la 12^{ème} colonne en prenant soin de sauter la 5^{ème} et la 9^{ème} colonne (blanc + solution de DPPH°). Les gammes de concentrations sont de l'ordre de 500 µg.ml⁻¹ à 1,95 µg.ml⁻¹ pour les extraits à tester et de 35,71 µg.ml⁻¹ à 0,14 µg.ml⁻¹ pour l'acide ascorbique, obtenues en une série de dilutions successives à facteur 1/2.

Plaques de tests (fond en V).

Mettre 200µl de tween 80 1 % dans les puits de la 1^{ère} colonne.

Prendre 10 µl de blanc et de contrôle de la plaque de dilution, les mettre successivement sur la plaque test dans les puits correspondants. Prendre 10 µl de solution des autres colonnes à partir des zones les plus diluées (colonne 12), les mettre dans les puits correspondants de la plaque test.

Mettre 200 µl d'une solution de tween 80 1 % de DPPH° 0,004 % (m/v) dans les puits de toutes les autres colonnes.

La plaque test est incubée dans une chambre noire à la température ambiante locale pendant 30 minutes. Les extraits à propriété antioxydante sont reconnaissables par l'apparition de zones jaunes sur fond violet.

La lecture de la plaque pour établir les densités optiques était déterminée à l'ELISA Reader (Bio-Rad Model 680, France) à 550 nm. Les pourcentages d'activité antioxydante sont donnés par l'équation suivante :

$$\% \text{ Inhibition du DPPH}^\circ = \frac{(x - b) \times 100}{y}$$

Avec, x l'absorbance de la solution du produit testé en présence du DPPH°, y l'absorbance moyenne des

solutions de blanc + DPPH° et b l'absorbance moyenne des solutions de blanc.

Au préalable avant d'utiliser la microplaque, il convient d'en faire une mesure à l'ELISA Reader à vide à 550 nm. Pour chaque puits, la valeur d'absorbance à vide sera déduite de celle mesurée lors de l'expérience proprement dite.

2.7. Analyses statistiques

Pour le traitement des données nous sommes servis du logiciel Origin® version 6.1 (OriginLab Corporation, NorthHampton, MA 01060 USA) pour toutes les analyses statistiques et les déterminations des valeurs IC₅₀, les concentrations auxquelles l'activité évaluée est réduite de 50 %.

Nous avons réalisé une Analyse de Variance (One-Way ANOVA). Nous avons considéré les différences significatives au seuil de signification 0,05.

Les valeurs IC₅₀ (en µg.ml⁻¹), calculées pour chaque essai, sont déterminées graphiquement à partir de la courbe sigmoïde du % d'inhibition en fonction du logarithme des concentrations des extraits testés et le standard.

3. Résultats

3.1. Criblage phytochimique

Les tests révélateurs des groupes chimiques réalisés sur les extraits aqueux totaux sont représentés dans le Tableau 2. D'un test à l'autre, nous notons l'absence des quinones, des terpènes et stéroïdes et des tannins catéchiques. Les autres métabolites secondaires parmi lesquels les alcaloïdes, les anthocyanes, les flavonoïdes, les saponosides et les sucres réducteurs, leurs fréquences varient d'un échantillon à l'autre.

3.2. Rendements d'extraction

Les rendements des extractions calculés à partir des décoctions aqueuses de poudres des feuilles des lyophilisats obtenus sont de 11,78 % pour le *Megaphrynum macrostachyum* et de 16,95 % pour le *Palisota hirsuta*.

Tableau 2. Screening des constituants chimiques des feuilles de *Megaphrynium macrostachyum* et de *Palisota hirsuta*

Groupes Chimiques	<i>M. macrostachyum</i>	<i>P. hirsuta</i>
Alcaloïdes	++	+++
Anthocyanes	++	+++
Flavonoïdes	++++	++++
Quinones	-	-
Saponines	+	++
Terpènes et Stéroïdes	-	-
Sucres réducteurs	++	+++
Tannin Galliques	++	++
Tannins Catéchiques	-	-

++++ : très abondant, +++ : abondant, ++ : assez abondant, + : présent, - : absent

3.3. Activités biologiques

Les résultats d'antibiogramme obtenus sont résumés dans le Tableau 3. Les souches de *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* et *C. albicans* se sont révélées bactériostatiques face aux extraits aqueux totaux de *Megaphrynium macrostachyum* et de *Palisota hirsuta*, aux concentrations de 50 µg et 100 µg, comparativement à la ciprofloxacine qui a enregistré la plus forte activité vis-à-vis des souches testées et seul le chloramphénicol n'a montré aucun effet inhibiteur.

Les extraits aqueux totaux de *Megaphrynium macrostachyum* et de *Palisota hirsuta* contiennent des composés à activité antioxydante. Ces composés n'ont pas été identifiés mais leurs Rf ont été déterminés de même que ceux de l'isoquercétrine et la quercétine aux Rf respectivement de 0,63 et 0,94 comme résumé dans le Tableau 4. La meilleure élution est obtenue avec la phase mobile polaire (acétate d'éthyle / acide acétique / acide formique / eau ; 100 : 11 : 11 : 27, V / V / V / V) qui présente un nombre de taches ou « spots » jaunes sur fond violet plus élevé que celle de la phase mobile moins polaire (butanone-2 / toluène ; 4 : 6, V / V). Dans cette dernière phase, aucun extrait n'a migré.

Le *Palisota hirsuta* présente 6 taches « spots » de composés à activité antioxydante, contre seulement 4 pour le *Megaphrynium macrostachyum*.

Les extraits totaux aqueux de *Megaphrynium macrostachyum* et de *Palisota hirsuta* ont révélé des propriétés antioxydantes avérées, se traduisant par le virement de la coloration violette au jaune. Les valeurs

IC₅₀ de *M. macrostachyum* et de *P. hirsuta* sont de l'ordre de 15,92 µg.ml⁻¹ et 6,49 µg.ml⁻¹ respectivement, face à l'acide ascorbique, qui a une valeur IC₅₀ de 5,11 µg.ml⁻¹ (Tableau 5)

Tableau 4. Les Rf des composés à activité antioxydante des extraits de feuilles

Natures des extraits	Rf des substances actives
<i>Megaphrynium macrostachyum</i> (Benth.) Milne-Redh.	0,04 - 0,16 - 0,24 - 0,41
<i>Palisota hirsuta</i> (Thunb.) K. Schum.	0,04 - 0,11 - 0,16 - 0,26 - 0,46 - 0,70
Isoquercétrine	0,63
Quercétine	0,94

L'analyse de la variance (a révélé que la différence des moyennes des % inhibition du radical DPPH° entre les extraits de feuilles de *M. macrostachyum*, de *P. hirsuta* et l'acide ascorbique n'est pas significative (52,30 ± 31,63 % ; 43,07 ± 26,99 % et 66,60 ± 39,37 % respectivement) (F = 1,15 ; p = 0,33 ; ddl = 8) (Tableau 5).

Tableau 5. Les valeurs IC₅₀ et % inhibition du radical DPPH° des produits testés.

Natures des extraits	IC ₅₀ (µg.ml ⁻¹)	Inhibition du DPPH° (%) *
<i>Megaphrynium macrostachyum</i> (Benth.) Milne-Redh.	15,92	52,30 ± 31,63
<i>Palisota hirsuta</i> (Thunb.) K. Schum.	6,49	43,07 ± 26,99
Acide ascorbique	5,11	66,60 ± 39,37

Tableau 3. Diamètres des zones d'inhibition des extraits de feuilles de *M. macrostachyum*, de *P. hirsuta* et des standards

Natures des extraits	Charge des disques (µg)	Zone d'inhibition (mm)				
		Bactérie				Levure
		Gram-		Gram+		
		<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
<i>Megaphrynium macrostachyum</i> (Benth.) Milne-Redh. Décocté des feuilles	50	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0
<i>Palisota hirsuta</i> (Thunb.) K. Schum. Décocté des feuilles	50	0	0	0	0	0
	100	-	-	-	-	-
Ampicilline	10	0	25	0	0	0
Chloramphénicol	30	0	0	0	0	0
Ciprofloxacine	5	35	21	43	30	25
Gentamicine	10	7	11	25	25	21
Métronidazole	100	9	0	55	9	0

0 : pas de zone d'inhibition, - : non déterminé

Les chiffres en gras indiquent la sensibilité des souches vis-à-vis des substances testées.

Il s'agit des moyennes de deux essais.

La figure 1 met en exergue l'activité réductrice du radical DPPH^o des différents extraits.

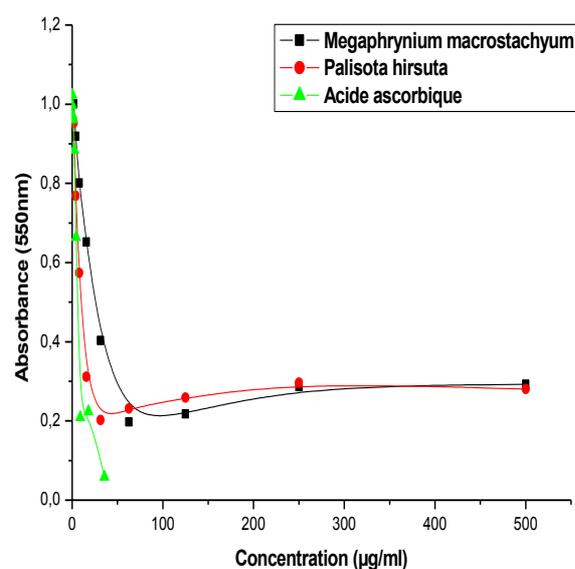


Figure 1. Activité réductrice du radical DPPH^o des différents extraits de feuilles de *M. macrostachyum*, de *P. hirsuta* et de l'acide ascorbique.

4. Discussion

Les tests phytochimiques réalisés sur les feuilles de *Megaphrynium macrostachyum* et de *Palisota hirsuta* montrent que les feuilles contiennent des alcaloïdes, des anthocyanes, des flavonoïdes, des tannins galliques, des saponosides, des sucres réducteurs et sont exemptés des quinones, des

tannins catéchiques, et des terpènes et stéroïdes (Tableau 2).

Les travaux de Bouquet (1970 ; 1972) réalisés sur les feuilles, écorces et racines de *P. ambigua* (espèce congolaise-Brazzaville) ont montré que les feuilles et écorces étaient exemptes d'alcaloïdes, de flavonoïdes, de saponosides, de tannins, de quinones et de glucosides cyanogénétiques, excepté dans les racines où a été révélée la présence de terpènes et stéroïdes ; d'autre part, les études d'Augier reprises par Kerharo & Adam, (1974) et corroborées par Wome (1985) réalisées sur les racines de *P. hirsuta* (espèce congolaise-Kinshasa) ont révélé la présence des glucides ou sucres réducteurs ; par ailleurs, les études de Drewes et al., (2002) reprises par Boua et al., (2008) réalisées sur les feuilles de *P. hirsuta* (espèce ivoirienne) ont révélé la présence de flavonoïdes ; tandis que, dans celles de Boakye-Gyasi et al., (2008 ; Woode et al., (2009a, b ; 2010) ; Boakye-Gyasi, (2009) ; Boakye-Gyasi et al., (2011) réalisées respectivement sur les racines et feuilles de *P. hirsuta* (espèce ghanéenne) ont montré que les racines étaient exemptes de saponines, de glucosides et de sucres réducteurs, mais l'analyse de feuilles a révélé la présence d'alcaloïdes, de triterpènes, de flavonoïdes, de sucres réducteurs, de saponines, de glycosides et de tannins.

Les plantes de la famille des Marantaceae n'ont pas encore fait l'objet d'études phytochimiques

approfondies. Les composés isolés du genre *Palisota* sont ceux des travaux de Egger & Kleinig-Voigt, (1968); Kusamba et al., (1995) repris par Neuwinger (1996), ont rapporté d'une part la présence des caroténoïdes dans les fruits et de β -citaurine comme colorant principal. Ils sont estérifiés avec des acides gras saturés de C₄, C₆ jusqu'à C₁₈; l'acide gras principal est l'acide laurique. Les colorants mineurs sont zeaxanthine, cryptoxanthine, β - et ζ -carotène et β -apo-8'-caroténal. Comme les Araceae, les Commelinaceae contiennent des cristaux d'oxalate de calcium dans des faisceaux de raphide. D'autre part, ils isolèrent deux phytoecdysones rares (ecdystéroïdes) des rhizomes (espèce R.D. Congolaise): ecdystérone (0,34 %) et 20,26-dihydroxyecdysone à côté des substances déjà connues comme le stigmastérol et l'acide éicosanique. A quelques différences près, les résultats des travaux sur le genre *Palisota* corroborent avec les nôtres.

Au terme de l'activité antimicrobienne, les extraits aqueux totaux de feuilles de *M. macrostachyum* et de *P. hirsuta* n'ont démontré aucune activité inhibitrice aux doses testées sur *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* et *C. albicans* toutes résistantes aux doses testées (Tableau 3). Tandis que, les travaux de Anani et al. (2000) réalisés sur les extraits méthanoliques de feuilles de *P. hirsuta* (espèce togolaise) à 100 mg/ml n'ont révélé aucune activité sur les souches de *K. pneumoniae*, *P. Aeruginosa* et *C. albicans*, mais les souches de *E. coli* et *S. aureus* ont été sensibles; une autre des études de (Magassouba et al., 2010) réalisées sur les feuilles de *P. hirsuta* (espèce guinéenne) ont rapporté des propriétés antibactériennes. Les travaux de Adebayo & Kolawole (2010) réalisés sur les extraits de feuilles de *M. macrostachyum* (espèce nigériane) ont démontré *in vitro* une activité antifongique sur *Penicillium sp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *S. chevalieri*, *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Rhizopus sp.*, *Mucor sp.*

En ce qui concerne l'activité antioxydante, l'analyse qualitative sur CCM a montré que les extraits de plantes testées ont des composés à propriété antioxydante avérée. Les extraits aqueux totaux de feuilles de *M. macrostachyum* et de *P. hirsuta* ont révélé un nombre plus élevé de substances actives dans la phase mobile polaire, ces composés sont donc polaires, avec des taches

franchement positives aux Rf 0,41 et 0,70 respectivement; face aux molécules de l'isoquercétrine et la quercétine qui ont des Rf de 0,63 et 0,94 successivement (Tableau 4). La variation des Rf est probablement due au poids moléculaire et à la polarité d'une substance donnée. Les extraits de feuilles de *M. macrostachyum* et le *P. hirsuta* ont deux des substances actives aux mêmes Rf de 0,04 et 0,16 dont les identités restent à confirmer (Tableau 4). Cependant, l'analyse quantitative sur microplaque des extraits de plantes de *M. macrostachyum* et le *P. hirsuta* ont donné des valeurs IC₅₀ de l'ordre de 15,92 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ et 6,49 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ respectivement, comparable à la molécule de référence, l'acide ascorbique, qui a une valeur IC₅₀ de 5,11 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ (Tableau 5). Par ailleurs, les études de Boakye-Gyasi (2009); Boakye-Gyasi et al., (2011) réalisées sur les extraits éthanoliques et hydroalcooliques de feuilles de *P. hirsuta* (espèce ghanéenne) ont révélé une activité antioxydante sur le DPPH° aux valeurs IC₅₀ de l'ordre de $1,77 \pm 0,40 \times 10^{-1} \text{ mg}.\text{ml}^{-1}$ et de 177 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ respectivement. Le degré de l'activité antioxydante diminue de *P. hirsuta* à *M. macrostachyum*.

L'activité des extraits de plantes testées vis-à-vis du DPPH° pourrait être due notamment aux polyphénols (tannins, flavonoïdes, etc.) qu'ils contiennent. Par exemple pour le *M. macrostachyum* (espèce congolaise-Kinshasa), l'activité antioxydante est due à la vitamine C en faible quantité dans les racines (8mg/100g) (Asato et al., 1995).

5. Conclusion

P. hirsuta peut être utilisé en thérapie médicale au regard de son activité antioxydante *in vitro*. Ce qui pourrait justifier ses diverses utilisations en ethnopharmacologie. Cependant, d'autres fractions de *P. hirsuta* devront être testées pour voir où seraient concentrées le mieux les principes actifs. Par ailleurs, la distribution phytogéographique de l'espèce *P. hirsuta* expliquerait la présence et/ou l'absence des groupements chimiques donnés sur une activité biologique spécifique. Faute des données étoffées sur la famille des Marantaceae et du *M. macrostachyum* de nombreuses études devront se poursuivre sur le screening-chimique et les analyses biologiques.

Remerciements

Nous remercions la ferme pilote Mbou-Mon-Tour à Bolobo. Nous remercions également l'herbarium de l'Institut National d'Etudes et de Recherches en Agronomie (INERA). Notre gratitude au Max-Planck Institute for Evolutionary Anthropology (MPI-EVA), à l'Institut National de Recherche Bio-Médicale (INRB) et au Dr Sabine Krief (MNHN).

6. Références

- Adebayo G.J., Kolawole A.L., (2010). *In vitro* activity of *Thaumatococcus daniellii* and *Megaphrynium macrostachyum* against spoilage fungi of white bread and 'Eba', an indigenous staple food in Southern Nigeria. African Journal of Microbiology Research, Vol. 4, 11, 1076-1081.
- Anani K., Hudson J.B., de Souza C., Akpagana K., Tower G.H.N., Arnason J.T. and Gbeassor M., (2000). Investigation of Medicinal Plants of Togo for Antiviral and Antimicrobial Activities. Pharmaceutical Biology, Vol. 38, No. 1, 40-45.
- Asato L., Takeda J., Sato H., Idani G. & Kano T., (1995). Vitamin C Content of Representative Plant Food Used by Horticulturalists in the Zaire Basin and its Evaluation. Humans and Nature, No. 5, 13-24.
- Boakye-Gyasi E., (2009). Anti-inflammatory and ethnopharmacological effects of an ethanolic leaf extract of *Palisota hirsuta* K. Schum. (Commelinaceae). Thesis of Kwame Nkrumah University of Science & Technology.
- Boakye-Gyasi E., Ainooson G.K. and Abotsi W.K.M., (2011). Anti-Inflammatory, Antipyretic and Antioxidant Properties of a hydroalcoholic Leaf Extract of *Palisota hirsuta* K. Schum. (Comelinaceae). West African Journal of Pharmacy, 22, 1, 10-18.
- Boakye-Gyasi E., Woode E., Ainooson G.K., Obiri D.D., Anah C., Duwiewua M. & Donkoh A., (2008). Anti-Inflammatory and Antipyretic Effects of An Ethanolic Extract of *Palisota hirsuta* K. Schum. Roots. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2 9, 191-199.
- Boua B.B., Békro Y.A., Mamyrbékova-Békro J.A., Coulibaly W.K. & Ehilé E.H., (2008). Assessment of Sexual Stimulant Potential of Total Flavonoids Extracted from Leaves of *Palisota hirsuta* Thunb. K. Schum. (Comelinaceae). European Journal of Scientific Research, Vol. 22, No. 4, 533-538.
- Bouquet A., (1969). Féticheurs et Médecines Traditionnelles du Congo (Brazzaville). Mémoires O.R.S.T.O.M., No. 36, Paris, 282 .
- Bouquet A., (1970). Sur des plantes médicinales du Congo-Brazzaville : Uvariopsis, Pauridiantha, Diospyros... Thèse de Doctorat de l'Université de Paris.
- Bouquet A., (1972). Plantes médicinales du Congo-Brazzaville. Uvariopsis, Pauridiantha, Diospyros... Travaux et documents de l'O.R.S.T.O.M., Paris, Vol. 1, No. 13, 116 .
- Cavin A.-L., (2007). Contribution à la connaissance taxonomique et chimique de fruits africains du genre *Detarium* (Fabaceae – Caesalpinioideae) : *D. microcarpum* Guill. et Perr. et des formes comestibles et toxiques de *D. senegalense* J.F. Gmel. Thèse de Doctorat de l'Université de Genève.
- Courgnaud V., Müller-Trutwin M., Sonigo P., (2004). Evolution et virulence des lentivirus de primates. Med. Sci., 20 , 448-452.
- Fruth B., Mato B.K. & Musuyu M.D., (2010). Nkundo plant use (Cuvette Centrale, DRC) with a focus on indigenous knowledge and the application of aphrodisiacs. Brüne M., Salter F. & W.C. McGrew (eds.), Building Bridges between Anthropology, Medicine and Human Ethology. Bochum : European University Press, 211-226.
- Haddouchi F., Lazouni H.A., Meziane A. & Benmansour, (2009). Etude physicochimique et microbiologique de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* Boiss & Reut. Afrique Science, 05, 2, 246-259.
- Huffman M.A., (1997). Current Evidence for Self-Medication in Primates: A Multidisciplinary Perspective. Yearbook of Physical Anthropology, 40, 171-200.
- Kechkar M.M., (2008). Extraction de la silymarine et étude de son activité antimicrobienne. Mémoire du Magister de l'Université Mentouri, Constantine.
- Krief S., (2003). Métabolites secondaires des plantes et comportemental animal : surveillance sanitaire et observation de l'alimentation de chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées. Thèse de Doctorat du Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris.
- Krief S., (2004). La pharmacopée des chimpanzés. Pour La Science, No. 325, 76-80.
- Krief S., Hladik C.-M., Haxaire C., (2005). Ethnomedicinal and bioactive properties of plants ingested by wild chimpanzees in Uganda. Journal of Ethnopharmacology, 101, 1-15.
- Loubaki B.C., Ouattara A.S., Ouattara C.A.T., Ouédraogo/Traoré R., Traoré A.S., (1999). Activités antimicrobiennes des extraits aqueux totaux de *Detarium microcarpum* [Cesalpinaceae (Guill. et Perr.)] sur huit espèces bactériennes impliquées dans certaines maladies au Burkina Faso. Rev. CAMES - Sciences et Médecine, Vol. 01, 66-73.
- Magassouba F.B., Diallo A., Kouyaté M., Mara F., Mara O., Bangoura O., Camara A., Traoré S., Diallo A.K., Zaoro M., Lamah K., Diallo S., Camara G., Traoré S., Kéita A., Camara M.K., Barry R., Kéita S., Oularé K., Barry M.S., Donzo M., Camara K., Toté K., Vanden Berghe D., Totté J., Pieters L., Vlietinck A.J., Baldé A.M., (2010). Corrigendum to "Ethnobotanical survey and antibacterial activity of some plants used in Guinean traditional medicine" [Journal of

- Ethnopharmacology, 114, 1, 2007, 44-53]. Journal of Ethnopharmacology, 128, 705-708.
- Mensah A.Y., Houghton P.J., Akyirem G.N.A., Fleischer T.C., Mensah M.L.K., Sarpong K., Adosraku R., (2004). Evaluation of the antioxidant and free radical scavenging properties of *Secamone afzelii* Rhoem. *Phytotherapy Research*, 18, 1031-1032.
- Messner E.J. & Wrangham R.W., (1996). In vitro Testing of the Biological Activity of *Rubia cordifolia* Leaves on Primate *Strongyloides* Species. *Primates*, 37, 1, 105-108.
- Musuyu M.D., (2006). Contribution à la revue des plantes médicinales des Nkundo au sud-ouest du Parc National de la Salonga. Mémoire de DEA de l'Université de Kinshasa.
- Musuyu M.D., Fruth B.I., Nzunzu L.J., Mesia G.K., Kambu O.K., Tona G.L., Cimanga K.R., Cos P., Maes L., Apers S., Pieters L., (2012). In vitro antiprotozoal and cytotoxic activity of 33 ethnopharmacologically selected medicinal plants from Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology*, 141, 301-308.
- N'guessan K., Kadja B., Zirihi N.G., Traore D. & Aké-Assi L., (2009). Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire). *Science & Nature*, 6, 1, 1-15.
- Neuwinger H.D., (1996). African Ethnobotany : Poisons and Drugs. Chemistry, Pharmacology, Toxicology. Chapman & Hall, Weinheim, 360-364 ; 606-607.
- Neuwinger H.D., (2000). African Traditional Medicine : A Dictionary of Plant Use and Applications. Search system for diseases. Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart, 326; 374-375.
- Okusa P.N., Penge O., Devleeschouwer M., Duez P., (2007). Direct and indirect antimicrobial effects and antioxidant activity of *Cordia gillettii* De Wild (Boraginaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 112, 476-481.
- Orth G. & Sansonetti P., (2006). La maîtrise des maladies infectieuses. Un défi de santé publique, une ambition médico-scientifique. Rapports sur la Science et la Technologie, Académie des Sciences, EDP Sciences, Paris, 24, 487.
- Pibiri M.-C., (2006). Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de Doctorat de l'Ecole Polytechnique Fédérale, Lausanne.
- Tutin C.E.G., (1999). Ecologie et organisation sociale des primates de la forêt tropicale africaine : aide à la compréhension de la transmission des rétrovirus.
- Wome B., (1985). Recherches ethnopharmacognosiques sur les plantes médicinales utilisées en médecine traditionnelle à Kisangani (Haut-Zaïre). Thèse de Doctorat de l'Université Libre de Bruxelles.
- Woode E., Boakye-Gyasi E., Ainooson G.K., Ansah C. & Duwiejua M., (2009a). Anti-Nociceptive Effects and the Mechanism of *Palisota hirsuta* K. Schum. Leaf Extract in Murine Models. *International Journal of Pharmacology*, 5 (2) : 101-113.
- Woode E., Boakye-Gyasi E., Amidu N., Ansah C. & Duwiejua M., (2010). Anxiolytic and Antidepressant Effects of a Leaf Extract of *Palisota hirsuta* K. Schum. (Commelinaceae) in Mice. *International Journal of Pharmacology*, 6, 1, 1-17.
- Woode E., Boakye-Gyasi E., Danquah C.A., Ansah C. & Duwiejua M., (2009b). Anti-Arthritic Effects of *Palisota hirsuta* K. Schum. Leaf Extract in Freund's Adjuvant-Induced Arthritic in Rats. *International Journal of Pharmacology*, 5, 3, 181-190.
- Yamakoshi G., (2004). Food seasonality and socioecology in Pan : are west african chimpanzees another bonobo? *African Study Monographs*, 25, 1, 45-60.