

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**ESTUDO COMPARATIVO DE *Glycyrrhiza glabra* (ALCAÇUZ) E
Periandra dulcis (ALCAÇUZ-DA-TERRA).**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Andriéli Cassel Feltrin

Santa Maria, RS, Brasil.

2010

**ESTUDO COMPARATIVO DE *Glycyrrhiza glabra* (ALCAÇUZ) E
Periandra dulcis (ALCAÇUZ-DA-TERRA).**

por

Andriéli Cassel Feltrin

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas.**

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Margareth Linde Athayde

Santa Maria, RS, Brasil.

2010

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**ESTUDO COMPARATIVO DE *Glycyrrhiza glabra* (ALÇAÇUZ) E
Periandra dulcis (ALÇAÇUZ-DA-TERRA).**

elaborada por
Andriéli Cassel Feltrin

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:

Margareth Linde Athayde, Dr^a.
(Presidente/Orientador)

Lauren Crossetti Vaucher, Dr^a. (UFSM)

Paula Rossini Augusti, Dr^a. (UNIPAMPA)

Santa Maria, 13 de setembro de 2010.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela presença constante.

A Universidade Federal de Santa Maria pela oportunidade.

A Professora Doutora Margareth Linde Athayde pelo carinho, paciência e ensinamentos.

Ao Professor Doutor Sydney Hartz Alves pelo auxílio na realização das análises.

Aos colegas do Laboratório de Fitoquímica pelo apoio e companheirismo.

A Aline, Vanessa, Jana e Michel pela amizade incondicional.

Aos meus pais Maria Helena e Élvio pelo carinho, compreensão, apoio, e por não me deixar desistir.

A Anne por aguentar minhas frustrações e pelo desafio.

Ao Marcel pela convivência, paciência, ajuda, insistência e carinho.

Aos amigos por tornar a vida mais divertida.

Aos que contribuíram de alguma forma para esta dissertação os mais sinceros agradecimentos.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

ESTUDO COMPARATIVO DE *Glycyrrhiza glabra* (ALÇAÇUZ) E *Periandra dulcis* (ALÇAÇUZ-DA-TERRA).

AUTORA: ANDRIÉLI CASSEL FELTRIN

ORIENTADORA: MARGARETH LINDE ATHAYDE

Local e Data da Defesa: Santa Maria, 13 de setembro de 2010.

A família Fabaceae é constituída por aproximadamente 18000 espécies em 650 gêneros, com ampla distribuição geográfica. As espécies *Glycyrrhiza glabra* (alçaçuz) e *Periandra dulcis* (alçaçuz-da-terra) pertencem à família Fabaceae. Alçaçuz exhibe uma variedade de atividades farmacológicas, como antiúlcera, antiinflamatória, antioxidante, antimicrobiana, entre outras. Na etnomedicina brasileira, *P. dulcis* é utilizado como substituto/adulterante de *G. glabra*. O presente trabalho objetivou a diferenciação das plantas quanto à atividade antioxidante, o perfil cromatográfico por CLAE e à atividade antimicrobiana. As raízes das plantas foram moídas e maceradas utilizando como solvente etanol:água (70:30, v/v). Fez-se fracionamento dos extratos brutos com solventes orgânicos de polaridades crescentes (CH₂Cl₂, AcOEt, n-BuOH). O extrato bruto e as frações foram investigados quanto ao conteúdo de polifenóis totais, atividade antioxidante pelo método do DPPH e inibição da peroxidação lipídica pelo método do TBARS. O conteúdo de fenóis totais variou de 70,29 ± 2,98 a 85,78 ± 1,08 mg/g para *P. dulcis* e 137,7 ± 1,37 a 83,26 ± 2,71 mg/g para *G. glabra*. No ensaio do DPPH, a fração diclorometano foi mais eficiente na captação de radicais livres em ambas as plantas. A fração butanólica de *P. dulcis* demonstrou a maior inibição dos níveis de TBARS, com IC₅₀ de 1,38 ± 1,22 µg/mL e melhor decaimento gráfico. Em *G. glabra*, a fração diclorometano demonstrou o melhor IC₅₀ de 1,91 ± 0,73 µg/mL, mas o melhor decaimento gráfico foi observado no extrato bruto. Utilizando o método proposto pela IV Edição da Farmacopéia Brasileira, foi possível diferenciar as plantas através dos perfis cromatográficos obtidos por CLAE. A ausência do ácido glicirrizínico é indício de adulteração. Contudo, o método não permite a identificação da planta adulterante. A atividade antimicrobiana das espécies foi semelhante, variando apenas para *Saccharomyces cerevisiae* e *Fusarium proliferatum*. O sub-fracionamento de *P. dulcis* melhorou a atividade frente à *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella pullorum*.

Palavras – chaves: Atividade antioxidante; grupos fenólicos; DPPH; TBARS; CLAE; atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

Master's Degree Dissertation
Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences
Federal University of Santa Maria

COMPARATIVE STUDY OF *Glycyrrhiza glabra* (LICORICE) AND *Periandra dulcis* (LICORICE-OF-THE-EARTH).

AUTHOR: ANDRIÉLI CASSEL FELTRIN

ADVISER: MARGARETH LINDE ATHAYDE

Place and Date of the Defense: Santa Maria, September 13th, 2010.

The Fabaceae family is comprised of approximately 18 000 species in 650 genera, with wide geographic distribution. The species *Glycyrrhiza glabra* (licorice) and *Periandra dulcis* (licorice-of-the-earth) belong to the family Fabaceae. Licorice displays a variety of pharmacological activities, such as antiulcer, antiinflammatory, antioxidant, antimicrobial, among others. In ethnomedicine Brazilian, *P. dulcis* is used as a substitute/adulterant *G. glabra*. This study aimed to differentiate plants for antioxidant activity, the HPLC chromatographic profile and the antimicrobial activity. Plants roots were ground and macerated using as solvent ethanol: water (70:30, v/v). Became fractionation of crude extracts with organic solvents of increasing polarity (CH₂Cl₂, EtOAc, n-BuOH). The crude extract and the fractions were investigated for the content of total polyphenols, the antioxidant activity by DPPH and the inhibition of lipid peroxidation by TBARS method. The content of total phenolics ranged from 70.29 ± 2.98 to 85.78 ± 1.08 mg/g for *P. dulcis* and 137.7 ± 1.37 to 83.26 ± 2.71 mg/g to *G. glabra*. In the DPPH assay, the dichloromethane fraction was most effective in capturing free radicals in both plants. The butanol fraction of *P. dulcis* showed the greatest inhibition of TBARS, with IC₅₀ of 1.38 ± 1.22 µg/mL and better chart the decay. In *G. glabra*, the dichloromethane fraction showed the best IC₅₀ of 1.91 ± 0.73 µg/mL, but the best graphic decay was observed in the crude extract. Using the method proposed by the Brazilian Pharmacopoeia Fourth Edition, it was possible to differentiate the plants through the HPLC profiles. The absence of glycyrrhizin acid is evidence of falsification. However, the method does not allow the identification of the plant adulterant. The antimicrobial activity of the species was similar, varying only for *Saccharomyces cerevisiae* and *Fusarium proliferatum*. The sub-fractionation of *P. dulcis* improved activity against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella pullorum*.

Key words: Antioxidant activity; phenolic groups; DPPH; TBARS; HPLC; antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Aspecto geral de <i>Glycyrrhiza glabra</i>	7
Figura 2 - Estruturas químicas do ácido glicirrizínico (A) e ácido glicirretínico (B)	8
Figura 3 - Estrutura química dos flavonóides encontrados nas raízes de alcaçuz	9
Figura 4 - Estrutura química dos flavonóides encontrados nas folhas de alcaçuz	10
Figura 5 - Aspecto da florescência de <i>Periandra dulcis</i>	13
Figura 6 - Periandrinas isoladas de <i>Periandra dulcis</i>	15
Figura 7 - Estrutura química das periandradulcinas	16
Figura 8 - Perfil por CLAE das sub-frações 1, 2 e 3 de <i>P. dulcis</i>	61

MANUSCRITO 5.1

Figure 1 - Effects of different concentrations of crude extract, ethyl acetate, dichloromethane, and butanolic fractions from the roots of <i>P. dulcis</i> on Fe(II)-induced TBARS production in blood plasma	38
Figure 2 - Effects of different concentrations of crude extract, ethyl acetate, dichloromethane, and butanolic fractions from the roots of <i>G. glabra</i> on Fe(II)-induced TBARS production in blood plasma	39
Figure 3 - HPLC profile <i>G. glabra</i> . Chromatographic conditions: Isocratic mode, acetonitrile-phosphate buffer pH 7.0 95:5, v/v as mobile phase, detection at 254 nm.....	40
Figure 4 - HPLC profile of <i>P. dulcis</i> . Chromatographic conditions: isocratic mode, acetonitrile-phosphate buffer pH 7.0 95:5, v/v as mobile phase, detection at 254 nm.....	41

MANUSCRITO 5.2

Figure 1 - Molecular structure of: A) nucleus periandrins; B) glycyrrhinic acid 53

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO 5.1

Table 1 - Total phenolic (TP) contents and antioxidant activities (IC₅₀/DPPH) of *P. dulcis* and *G. glabra*. Values represent the means and standard error from three replicates 42

Table 2 – Calculated values of IC₅₀ (µg/mL) for crude extract and fractions from the roots of *Periandra dulcis* and *Glycyrrhiza glabra* in the TBARS assay. Values represent the means and standard error from three replicates 43

MANUSCRITO 5. 2

Table 1 - Minimum inhibitory concentration of *G. glabra* and *P. dulcis* 51

Table 2 - Minimum inhibitory concentration of sub-fractions of *P. dulcis* 54

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

^{13}C -RMN – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

Abs – Absorbância

AcOEt – Acetato de etila

BuOH – *n*-Butanol

CCD – Cromatografia em camada delgada

CH_2Cl_2 – Diclorometano

CIM - Concentração inibitória mínima

CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência

DPPH – 2,2-diphenyl-1-picrilhydrazyl

EtOH – Etanol

Fig. – Figura

GF₂₅₄ – Gel de sílica com indicador de fluorescência para λ 254 nm

HPLC – High performance liquid chromatography

IC₅₀ - Concentração necessária para inibir a atividade antioxidante em 50%

MeOH – Metanol

min. – Minutos

OMS – Organização Mundial da Saúde

TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

UV – Ultravioleta

λ – Comprimento de onda

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO	1
2 INTRODUÇÃO.....	2
3 OBJETIVOS	4
3.1 Objetivo geral	4
3.2 Objetivos específicos	4
4 REVISÃO DA LITERATURA.....	5
4.1 Plantas medicinais: fonte para o desenvolvimento de fitoterápicos.....	5
4.2 Descrições das plantas	6
4.2.1 Família Fabaceae.....	6
4.2.2 Glycyrrhiza glabra.....	6
4.2.3 Periandra dulcis.....	12
5 RESULTADOS	18
5.1 – Manuscrito 1..	18
5.2 – Manuscrito 2.	44
5.3 – Resultados adicionais	60
6 DISCUSSÃO.....	62
7 CONCLUSÕES.....	67
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

1 APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta dissertação são apresentados na forma de manuscritos, os quais se encontram no item resultados. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas encontram-se nos próprios manuscritos e representam na íntegra este estudo.

Os itens Discussão e Conclusão, dispostos após os manuscritos, contêm, interpretações e comentários gerais referentes ao presente estudo.

O item Referências Bibliográficas refere-se às citações que aparecem nos itens Introdução, Revisão Bibliográfica e Discussão desta dissertação.

2 INTRODUÇÃO

O uso medicinal de produtos naturais precede a história humana documentada. No decorrer da evolução, a humanidade fez uso de uma gama enorme de produtos naturais. Com o advento das técnicas de biologia molecular e síntese química, o uso de plantas medicinais caiu em desuso. Nas últimas décadas, entretanto, o interesse na utilização de compostos naturais tem sido renovado (KELLY *et al.*, 2005; KOEHN e CARTER, 2005; JI *et al.*, 2009).

As plantas representam uma importante fonte de moléculas ativas. A exploração desta fonte pela medicina pode contribuir para a busca de novos fármacos (COWAN, 1999; PINTO *et al.*, 2002). No entanto, a falta de descrição em códigos oficiais torna-se um obstáculo para a utilização de plantas como matérias-primas. A Farmacopéia Alemã contribui de forma expressiva com 324 plantas descritas, enquanto que a Farmacopéia Brasileira contribui com apenas 24 espécies (TOLEDO *et al.*, 2003).

Cerca de 80% dos medicamentos têm origem natural, e suas vendas ultrapassaram 65 bilhões de euros em 2003. Muitas substâncias constituem modelos para o desenvolvimento de medicamentos sintéticos modernos como, por exemplo, vinblastina, vincristina, podofilotoxina e paclitaxel (MONTANARI e BOLZANI, 2001; PATWARDHAN *et al.*, 2004).

A Organização Mundial de Saúde estima que cerca de 80% da população mundial faz uso de plantas para o tratamento de suas doenças, incluindo o uso *in natura* ou em formas que empregam plantas processadas em formulações medicamentosas. A Alemanha, por exemplo, consome metade dos extratos vegetais comercializados no continente Europeu. A população utiliza em casos de resfriados (66%), gripes (38%), doenças do trato digestivo ou intestinal (25%), dores de cabeça (25%), insônia (25%), entre outros (CALIXTO, 2000).

O Brasil possui cerca de 60.000 espécies de plantas, cerca de 20% de toda a flora mundial, com 75% de todas as espécies existentes nas grandes florestas. Estima-se, no entanto, que apenas 1.100 das 365.000 espécies catalogadas no mundo tenham sido estudadas em suas propriedades medicinais (GARCIA, 1995).

Se considerarmos que o Brasil possui a maior biodiversidade do planeta e

que sua contribuição com a produção científica mundial é de apenas 1,2%, fica evidente que o país tem potencial para o crescimento em biotecnologias, e ser destaque no cenário internacional (FUNARI e FERRO, 2005).

Atualmente, observa-se o ressurgimento da medicina natural, enfatizando as plantas medicinais para restabelecimento da saúde humana. Assim, a fitoterapia é encarada como opção na busca de soluções terapêuticas, utilizada principalmente pela população de baixa renda, já que se trata de uma alternativa eficiente, barata e culturalmente difundida (MORAES e SANTANA, 2001).

As espécies da família Fabaceae demonstram atividades biológicas como: antimicrobiana, anti-*Leishmania*, imunomodulatória, antioxidante, antiinflamatória, entre outras (MASTACHE *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2010; QUEIROZ *et al.*, 2010). Constituintes químicos variados como fenóis, terpenos, óleos voláteis, alcalóides, flavonóides e saponinas são os responsáveis pelo uso medicinal das plantas desta família (PIVATTO *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2006; TAVA *et al.*, 2007; IONKOVA, 2009).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo principal desta dissertação foi diferenciar as espécies *Glycyrrhiza glabra* e *Periandra dulcis*.

3.2 Objetivos específicos

- Quantificar os compostos fenólicos no extrato bruto e frações das plantas;
- Avaliar a atividade neutralizante de radicais livres das plantas pelo método do DPPH;
- Avaliar a capacidade de inibição da peroxidação lipídica dos extratos e frações pelo método do TBARS;
- Diferenciar as plantas através do perfil cromatográfico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- Avaliar a atividade antimicrobiana das frações e extrato brutos de *Glycyrrhiza glabra* e *Periandra dulcis*;
- Avaliar o sub-fracionamento de *Periandra dulcis* quanto à atividade antimicrobiana.

4 REVISÃO DA LITERATURA

4.1 Plantas medicinais: fonte para o desenvolvimento de fitoterápicos

Os estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais, que buscam a obtenção de novos fármacos, passam por um grande avanço científico. O desenvolvimento de novas técnicas espectroscópicas permite elucidar estruturas moleculares complexas de constituintes naturais. Testes pré-clínicos e bioensaios avaliam o potencial terapêutico de plantas medicinais e de alguns dos seus constituintes, como flavonóides, alcalóides, triterpenos e outros (FILHO e YUNES, 1998).

Os inúmeros constituintes das plantas podem apresentar efeitos sinérgicos devido à presença de compostos de classes ou estruturas diferentes contribuindo para a mesma atividade. Desta forma, a seleção de bioensaios para a detecção de efeitos específicos é importante no estudo da atividade biológica das plantas medicinais (MACIEL *et al.*, 2002).

Com a crescente procura por tratamentos alternativos, os fitoterápicos passaram a representar uma parcela significativa no mercado de medicamentos. No Brasil, estima-se que o consumo gere em torno de US\$ 160 milhões por ano. O mercado de medicamentos sintéticos cresce 4% ao ano, enquanto que o setor de fitoterápicos evolui para cerca de 15%. Estima-se que a cadeia produtiva de fitoterápicos, desde o cultivo até o produto final, movimenta anualmente cerca de R\$ 1 bilhão (CARVALHO *et al.*, 2008).

O menor custo de produção e o fato de que a grande maioria não se encontra sob proteção patentária tornam os fitoterápicos uma alternativa promissora para países pobres ou em desenvolvimento. Conseqüentemente, estimula-se a produção em larga escala de plantas medicinais (LOURENZANI *et al.*, 2004; ALVES *et al.*, 2008). Contudo, a transformação da planta em um fitoterápico deve preservar a integridade química e farmacológica do vegetal, garantindo a sua ação biológica e a sua segurança de utilização (TOLEDO *et al.*, 2003).

4.2 Descrições das plantas

4.2.1 Família Fabaceae

A família Fabaceae é uma das maiores entre o grupo das dicotiledôneas, agrupada em três subfamílias: Papilionoideae, Mimoseideae e Caesalpinioideae (BIONDO *et al.*, 2005). Papilionoideae, a maior subfamília de Fabaceae, está representada por aproximadamente 10.000 espécies e cerca de 500 gêneros (OLIVEIRA *et al.*, 2000).

As plantas são de hábito variado, desde grande árvores a arbustos, subarbustos, ervas anuais ou perenes e trepadeiras, vivendo em diferentes altitudes e latitudes. As folhas são sempre de disposição alterna, compostas, pari ou imparipenadas, com estípulas ou estipelas às vezes transformadas em espinhos. As folhas podem se apresentar modificadas em gavinhas ou estar reduzida a dois ou um só folíolo. Folhas e folíolos de todas as ordens sempre com pulvinos (articulações) na base, nos pecíolos ou nos peciólulos, que permitem movimentos diurnos (às vezes muito rápidos) às folhas em resposta a variados agentes (VIRTUOSO, 2005).

4.2.2 Glycyrrhiza glabra

4.2.2.1 Descrição

A espécie *Glycyrrhiza glabra* (Figura 1) é distribuída por regiões tropicais e de clima quente em diversas regiões do mundo, principalmente nos países do Mediterrâneo. No Brasil, é considerada como planta exótica.

É uma erva perene, com altura em torno de 1 metro e rizoma grosso. As folhas são pinadas, com 4-7 pares de folhetos, de formato oval. As flores são espigas axilares e de coloração violeta. As estruturas florais e frutos desta família representam o modo de polinização cruzada, principalmente resultando em

variabilidade da prole em gerações sucessivas. Apenas o rizoma da planta é utilizado com finalidade farmacológica (VIBHA *et al.*, 2009).

Glycyrrhiza glabra, popularmente conhecida como alcaçuz, pertence à família Fabaceae, subfamília Papilionoideae. É utilizada na medicina como antiinflamatória e antialérgica, principalmente em bronquites, asma, alergias, dermatites e eczemas. Nas indústrias de balas, bebidas não alcoólicas e tabaco, é usada pelo sabor adocicado (OLUKOGA e DONALDSON, 1998).



Figura 1 - Aspecto geral de *Glycyrrhiza glabra*
(adaptado de Vibha *et al.*, 2009)

4.2.2.2 Compostos isolados

Diversas substâncias já foram identificadas de alcaçuz, incluindo uma mistura complexa, solúvel em água e que corresponde a 40-50% do peso total do material seco. Este complexo é formado por saponinas, triterpenos, flavonóides, polissacarídeos, pectinas, açúcares simples, aminoácidos, sais minerais, entre outros (OBOLENTSEVA *et al.*, 1999).

O ácido glicirrizínico (figura 2A), uma saponina triterpênica pentacíclica encontrada nas raízes do alcaçuz, é responsável pelo sabor doce. Corresponde de 6-14% do peso das raízes secas. É uma molécula composta por uma parte hidrofílica, duas moléculas de ácido glicurônico, e uma parte hidrofóbica, o ácido glicirretínico (figura 2B) (ARIAS-CASTRO *et al.*, 1993; OBOLENTSEVA *et al.*, 1999).

O ácido glicirrizínico, quando submetido à hidrólise ácida, libera os ácidos 18 β - e 18 α -glicirretínico (WANG, 1994). O ácido glicirretínico é o maior responsável pelas atividades farmacológicas do alcaçuz. Visando a potencialização dos efeitos medicinais, derivados do ácido glicirretínico têm sido desenvolvidos por pesquisadores (INOUE *et al.*, 1989; MISHIMA *et al.*, 1989; GOLDBERG *et al.*, 1996; SHIMOYAMA *et al.*, 2010).

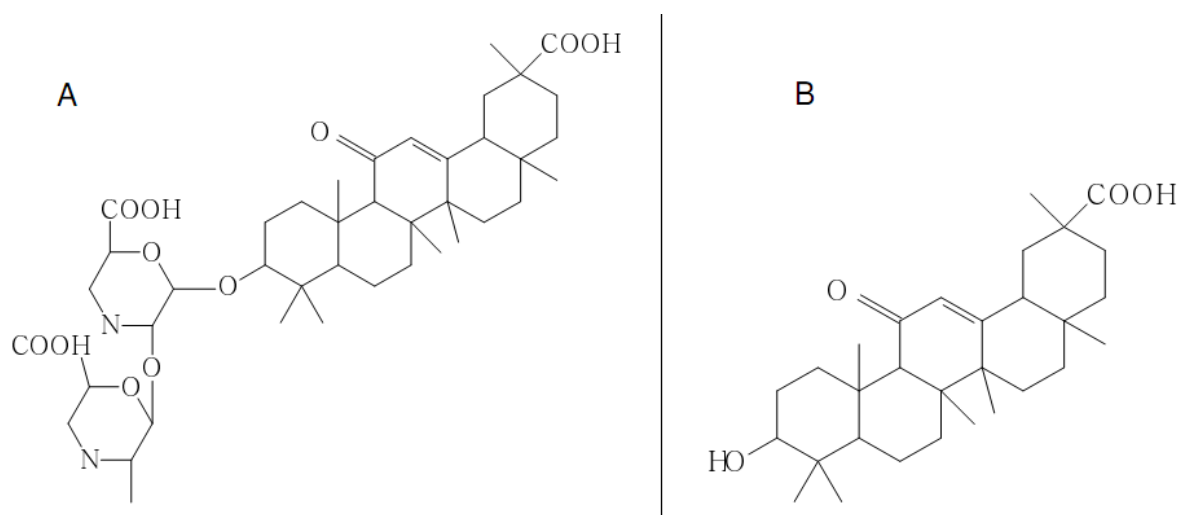


Figura 2 - Estruturas químicas do ácido glicirrizínico (A) e ácido glicirretínico (B)

A cor amarela da raiz do alcaçuz é devido ao alto teor de flavonóides da planta (figura 3), que inclui liquiritina, isoliquiritina, liquiritigenina, glabridina, entre outros

(VIBHA *et al.*, 2009). Glabridina é a principal isoflavona isolada exclusivamente das raízes do alcaçuz. É o constituinte de maior quantidade na fração hidrofóbica do extrato da planta, contribuindo para diversas atividades farmacológicas (AOKI *et al.*, 2005; YOKOTA *et al.*, 2006; YU *et al.*, 2008).

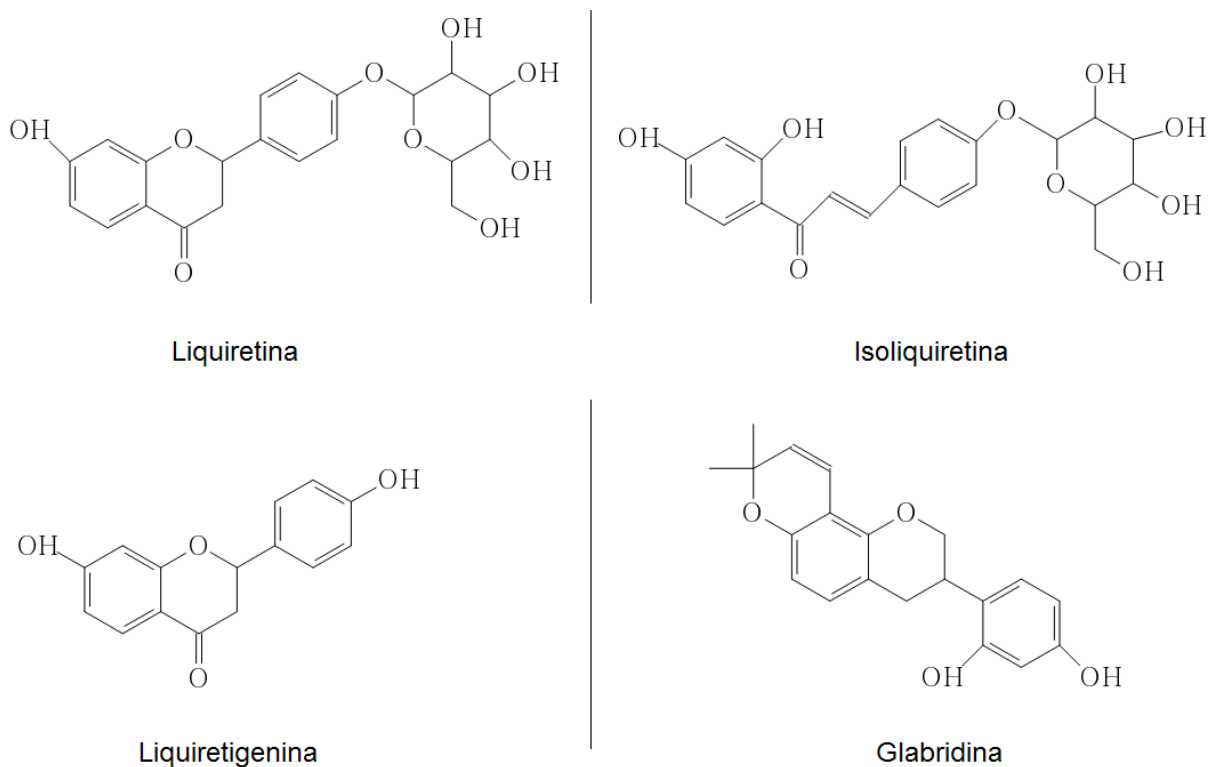


Figura 3 - Estruturas químicas dos flavonóides encontrados nas raízes de alcaçuz

Contudo, os flavonóides de *G. glabra* não estão localizados apenas na raiz. Grandes quantidades de pinocembrina e isoquercetina (figura 4) foram encontradas nas folhas da planta (HAYASHI *et al.*, 1996).

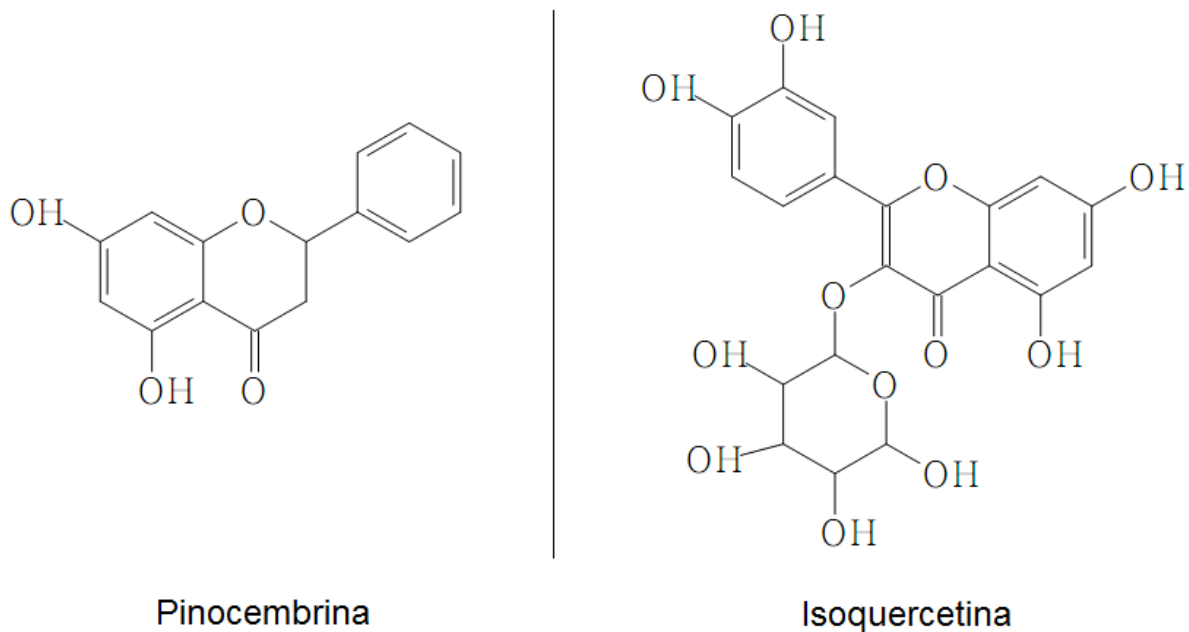


Figura 4 - Estruturas químicas dos flavonóides encontrados nas folhas de alcaçuz

4.2.2.3 Atividades biológicas

A atividade antimicrobiana de *G. glabra* é bem documentada (OKADA *et al.*, 1989; HARAGUCHI *et al.*, 1998). Em um estudo mais recente realizado por Ates e Erdogrul (2003), a atividade antimicrobiana das frações de *G. glabra* demonstraram zonas de inibição que variaram de 7-11 mm/20 µL contra os microorganismos testados. O extrato alcoólico não inibiu *Bacillus subtilis*, *Bacillus brevis*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Yersinia enterocolitica*. A fração acetato de etila não apresentou efeitos contra *Bacillus subtilis* e *Yersinia enterocolitica*, enquanto que a fração acetona não inibiu *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Yersinia enterocolitica*. A fração clorofórmio não mostrou efeito contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Yersinia enterocolitica*. Todos os extratos apresentaram ação contra *Bacillus megaterium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Mycobacterium smegmatus* e *Staphylococcus aureus*.

Na pesquisa realizada por Motsei *et al.* (2003) com plantas nativas da África do Sul, *G. glabra* demonstrou CIM de 1,56 mg/mL contra *Candida albicans* ATCC 10231. Em outro estudo, o extrato clorofórmio da planta foi ativo contra os fungos

Arthrinium sacchari e *Chaetomium funicola*, encontrados em bebidas comercializadas em garrafas PET (SATO *et al.*, 2000).

O ácido glicirretínico, isolado de *G. glabra*, teve atividade contra *Bacillus subtilis* (7,6 µg/mL) e *Staphylococcus epidermidis* (12,5 µg/mL) sem causar hemólise dos eritrócitos humanos. Com o auxílio da microscopia eletrônica, o ácido glicirretínico foi localizado no interior da bactéria, mas não provocou a ruptura da membrana. Em seguida, o composto inibiu a síntese de DNA, RNA e proteínas, elucidando o seu mecanismo de ação (KIM *et al.*, 2002).

Fukai *et al.* (2002) relatou, em dois estudos, o efeito antimicrobiano de glabridina contra *Helicobacter pylori* e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina. Posteriormente, Gupta *et al.* (2008) verificou sua atividade contra *Mycobacterium tuberculosis* (29,165 µg/mL).

A atividade antioxidante do alcaçuz está bastante elucidada por diversos métodos (VISAADIYA e NARASIMHACHARVA, 2006; ASGARY *et al.*, 2007; CHIN *et al.*, 2007). Isoflavonas (glabridina, hispaglabridina A, hispaglabridina B, 4'-*O*-metilglabridina e 3'-hidroxi-4'-*O*-metilglabridina) de *G. glabra* protegeram as funções mitocondriais na presença de estresse oxidativo (HARAGUCHI *et al.*, 2000). Os compostos hispaglabridina B, isoliquiritigenina e paratocarpina B demonstraram ser potentes agentes anti-oxidantes no ensaio com peroxinitrito (CHIN *et al.*, 2007). Hispaglabridina A, hispaglabridina B, glabridina e 4'-*O*-metilglabridina preveniram a oxidação do β-caroteno e da lipoproteína de baixa densidade (VAYA *et al.*, 1997).

Glycyrrhiza glabra e seus constituintes possuem propriedades anticancerígenas. Eles inibem a proliferação anormal de células em formação do tumor de mama, fígado e pele (RATHI *et al.*, 2009). O extrato aquoso de *G. glabra* foi um forte antidepressivo para camundongos, sendo sua eficácia comparada a imipramina e fluoxetina. Outras atividades como expectorante, diurética, antiinflamatória, ansiolítica, estimulante cerebral, anti-úlceras, antipirético e anticonvulsivante são atribuídas ao alcaçuz (DHINGRA e SHARMA, 2006).

4.2.3 *Periandra dulcis*

4.2.3.1 Descrição

O gênero *Periandra* (Fabaceae) inclui 13 espécies e três variedades, com distribuição neotropical, encontradas especialmente em campos e cerrados. (FUNCH e BARROSO, 1999).

A espécie *Periandra dulcis* (Figura 5) é um arbusto pequeno, ereto, de 3 metros de altura, apresentando a casca brancacenta e ramos articulados e pubescentes. As folhas são compostas de três folíolos quase sésseis, oblongos ou lanceolados, rígidos, glabros na página superior e saliente-nervados na inferior, mais ou menos agudos de 9 centímetros de comprimento. As flores são azuis, roxo-escuras ou mesmo purpúreas, dispostas em racimos axilares ou terminais, grandes e pendentes. O fruto é uma vagem linear e chata que mede 14 centímetros e pode conter até 10 sementes. Apresenta raiz sublenhosa, de epiderme preta, interiormente amarela e agridoce (CORRÊA, 1984).

É cultivada no nordeste e centro do Brasil e em lugares pedregosos, campos altos e úmidos. Conhecida popularmente como alcaçuz brasileiro ou alcaçuz-da-terra, *Periandra dulcis* é encontrada em ervateiras e preparações farmacêuticas como substituta de *Glycyrrhiza glabra*, com ação antiinflamatória, expectorante, diurética e laxativa (OLIVEIRA e SAITO, 1989; SUTTISRI *et al.*, 1993; DANTAS e GUIMARÃES, 2007).



Figura 5 - Aspecto da florescência de *Periandra dulcis*

Disponível em: <<http://www.naturenetwork.com.br/images/alcacuz.jpg>>

4.2.3.2 Compostos isolados

Hashimoto *et al.* (1980) publicaram o primeiro estudo realizado com as raízes de *Periandra dulcis*, adquirida da Moageira Botânica Índex Ltda, em 1976, no Brasil. O extrato hidroalcoólico das raízes foi submetido à cromatografia em coluna com sílica gel, eluindo a periandrina II e, posteriormente, a periandrina IV.

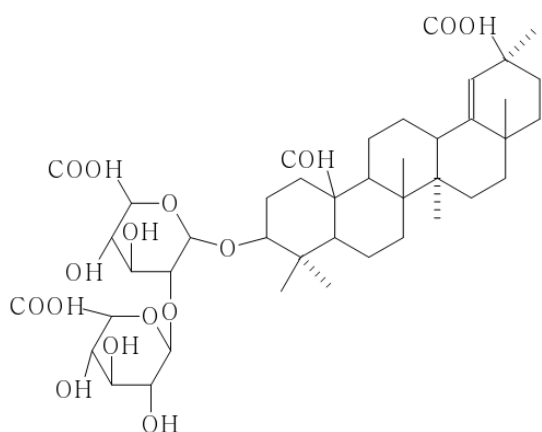
A estrutura química da periandrina III foi elucidada em 1982 a partir do tratamento do extrato hidroalcoólico com n-butanol e etanol (3:1) Após cromatografia, 600 mg do novo extrato resultou em 200 mg do triterpeno.

Em outro estudo realizado pelo mesmo grupo em 1983, os pesquisadores obtiveram o triterpeno glicosilado denominado de periandrina I. A partir deste triterpeno, várias outras substâncias foram identificadas por reações diversas. Com a hidrólise ácida, periandrina I deu origem a um ácido glucurônico, o ácido

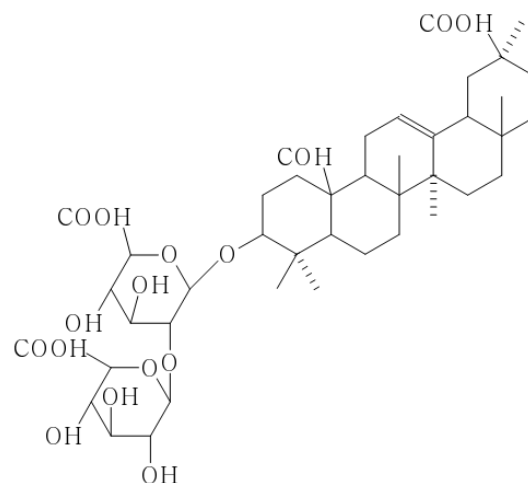
periândrico e um triterpenóide não identificado. A hidrólise enzimática da periandrina I por uma β -glucuronidase gerou o triterpenóide não identificado e a prosapogenina, com sabor doce. Prosapogenina é um monoglucoronídeo derivado do ácido periândrico.

Em 1984, Hashimoto *et al.* isolaram da fração acetato de etila os compostos ácido 3 β -hidroxi-25-al-olean-18-en-30-óico e ácido 3 β -hidroxi-25-al-olean-12-en-30-óico, denominados ácido periândrico I e II, respectivamente.

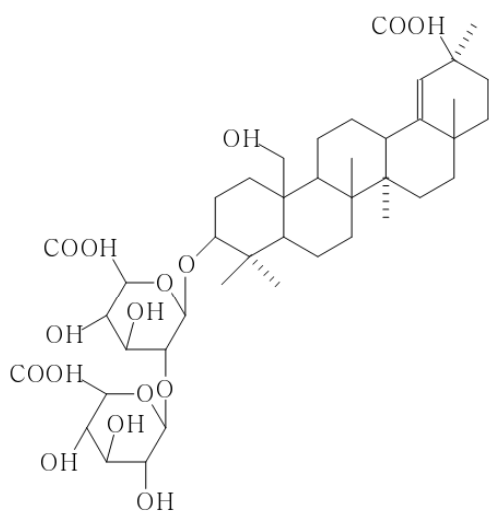
Finalmente, em 1993, Suttisri *et al.* divulgaram a estrutura química da periandrina V. A fração acetato de etila das raízes foi submetida a tratamento com metanol 80%. Após secura, 77,5 g do extrato resultante foram fracionados, originando 288 mg de periandrina V.



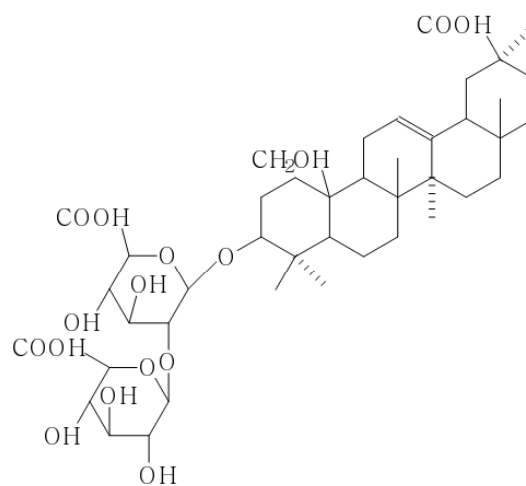
Periandrina I



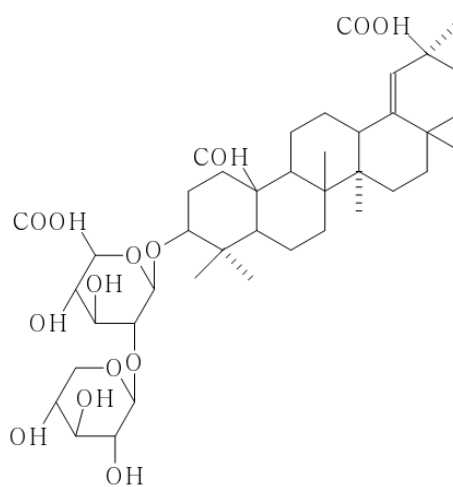
Periandrina II



Periandrina III



Periandrina IV



Periandrina V

Figura 6 - Periandrinas isoladas de *Periandra dulcis*

Após o tratamento das raízes com diversos solventes, o extrato butanólico foi submetido à CLAE em fase reversa, dando origem às frações A, B e C. A fração A demonstrou a presença da periandradulcina A. As periandradulcinas B e C foram localizadas na fração B, enquanto que a fração C mostrou alta concentração das periandrinas isoladas anteriormente (IKEDA *et al.*, 1991).

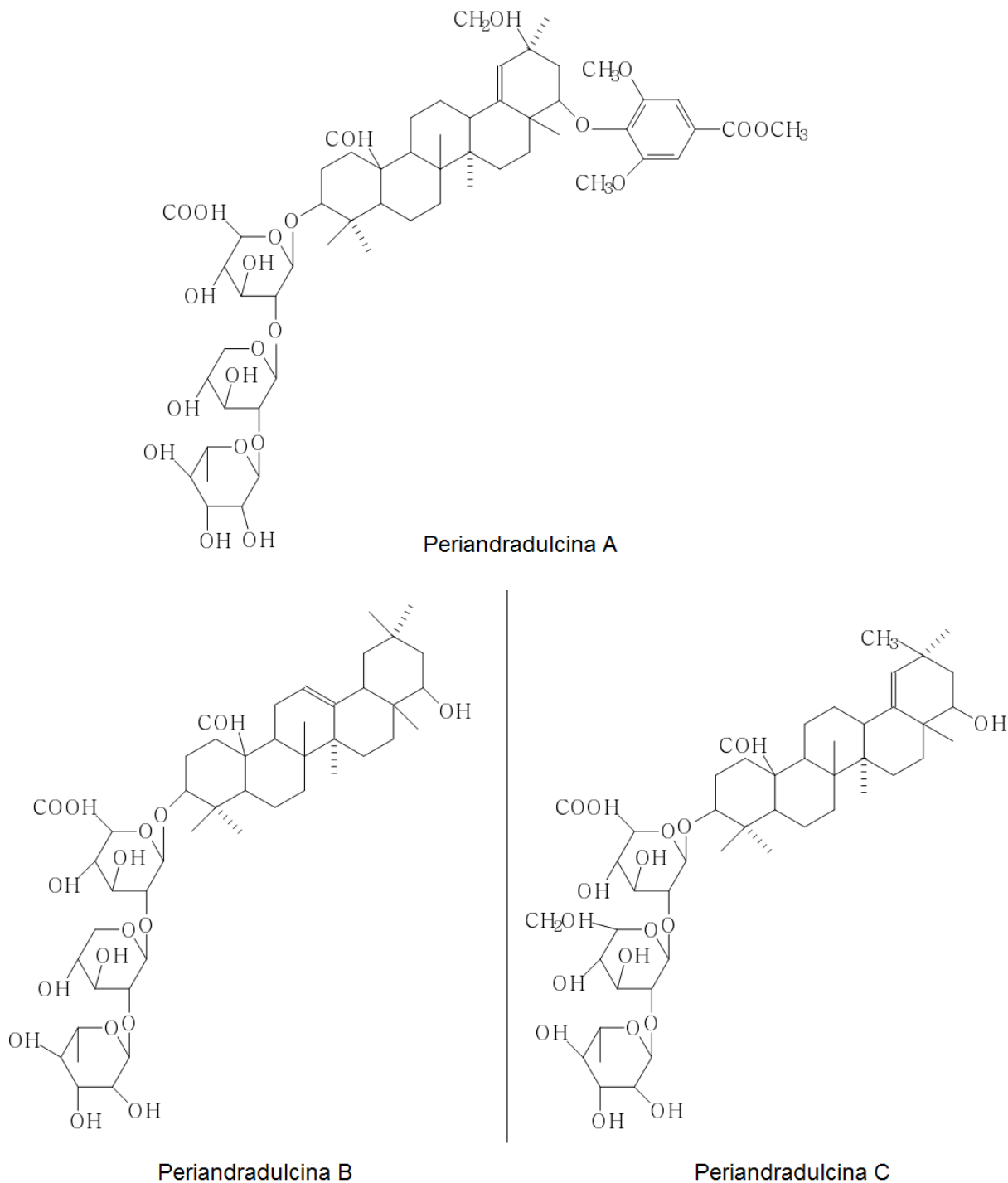


Figura 7 - Estruturas químicas das periandradulcinas

4.2.3.3 Atividades biológicas

Periandra mediterranea foi testada contra leishmaniose por Santos *et al.* (1997). Durante o estudo, verificou-se que a planta protegia os camundongos em até 87,7% contra *Leishmania donovani*, porém produzia hemólise nas células. Com a remoção do açúcar das saponinas, a hemólise era reduzida.

Os polissacarídeos de *Periandra mediterranea* demonstraram aumentar a fagocitose *in vivo* e inibir a reação inflamatória (PEREIRA *et al.*, 2000). Os extratos da mesma planta inibiram a elevação do fator α de necrose tumoral e a interleucina-6. O sintoma clínico e a destruição óssea associados à artrite em ratos foram inibidos pelo uso de *P. mediterranea* (MIYAGAWA *et al.*, 2004).

Contudo, para a espécie *Periandra dulcis*, poucas atividades biológicas são descritas. Britto *et al.*, em 1983, citam que o líquido obtido pela decocção das raízes de *P. dulcis* tem ação como antiasmático. A atividade inibidora da fosfodiesterase foi verificada nas periandradulcinas A, B e C. Os melhores resultados foram obtidos pela periandradulcina A (IKEDA *et al.*, 1991).

5 RESULTADOS

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de manuscritos. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas encontram-se nos próprios manuscritos. Em 5.3, resultados adicionais são descritos.

5.1 – Manuscrito 1. Comparison of *Glycyrrhiza glabra* (licorice) to the closely related species *Periandra dulcis* by means of antioxidant activities, total phenolic, and HPLC profile.

Comparison of *Glycyrrhiza glabra* (licorice) to the closely related species *Periandra dulcis* by means of antioxidant activities, total phenolics, and HPLC profiles.

ANDRIELI C. FELTRIN¹, ALINE A. BOLIGON¹, JANAINA K. FROHLICH¹, VANESSA JANOVIK¹, MICHEL M. MACHADO², CAROLINE BELLÓ², IVANA B. M. CRUZ², AND MARGARETH L. ATHAYDE^{*,1}

¹Departamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Universitário, 97105-900 Santa Maria - RS, Brasil,

²Departamento de Morfologia, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Universitário, 97105-900 Santa Maria – RS, Brasil.

* To whom correspondence should be addressed. Tel.: +55 5532208950, Fax +55 5532208248. e-mail address: margareth@smail.ufsm.br (M.L.Athayde)

ABSTRACT

Periandra dulcis is used in Brazil as a substitute/adulterant of *Glycyrrhiza glabra*. The aim of this study was to determine total phenolic contents, antioxidant activities, and to compare the HPLC profiles of both plants after the application of the Brazilian Pharmacopoeia method to licorice routine analysis. Plants roots were ground and macerated using as solvent ethanol: water (70:30, v/v). Became fractionation of crude extracts with organic solvents of increasing polarity (CH₂Cl₂, EtOAc, n-BuOH). Folin-Ciocalteu was used to determine the phenolic contents. Human plasma lipid peroxidation was induced with iron sulfate and the radical scavenging activity of the fractions and crude extracts was determined by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). The content of total phenolics ranged from 70.29 ± 2.98 to 85.78 ± 1.08 mg/g for *P. dulcis* and 137.7 ± 1.37 to 83.26 ± 2.71 mg/g to *G. glabra*. DPPH IC₅₀ varied from 34.37±1.20 to 313.59±0.27 µg/ml for *G. glabra* and from 325.01±0.48 to 1375.13±0.95 µg/ml for *P. dulcis*. The results suggest that phenolic compounds present in the dichloromethane fraction of *P. dulcis* may be responsible for the capture of free radicals. The same can not be considered for *G. glabra*. Butanolic fraction from *P. dulcis* showed the best results in the TBARS assay, while for *G. glabra* the dichloromethane fraction was more effective. By HPLC analysis, it was possible to determine the chromatographic profiles and distinguish them through the presence (*G. glabra*) or absence (*P. dulcis*) of 18β-glycyrrhethinic acid in the chromatograms.

KEYWORDS: *Glycyrrhiza glabra*; *Periandra dulcis*; Total phenolics; antioxidant activities; HPLC.

INTRODUCTION

Fabaceae is one of the largest botanical families with wide geographic distribution. There are approximately 18000 species in over 650 genera and several reports in the literature indicating pronounced biological activities along with the plants of this family (Rajeshwar et al., 2005; Kaur et al., 2006; Pourmorad et al., 2006). The species *Glycyrrhiza glabra* (Licorice, Alcaçuz) and *Periandra dulcis* belong to the Fabaceae family. Licorice is one of the most useful herbs in traditional medicine and has been used by physicians and herbalists since the earliest of times and is recorded in the pharmacopoeias of many countries, including China, Japan, United Kingdom, and Brazil (Brazilian Pharmacopeia, 2000; Biondi et al., 2005). Licorice extracts are currently used in the tobacco, pharmaceutical and confectionery industries; they are involved in the recipes of cough syrups, herbal supplements, chewing gums, drinks and candy, and also used to mask the bitter taste of medicines as a flavoring agent in foods and beverages in general (Mukhopadhyay and Panja, 2008). Licorice root extract can be also used to modify food foams and to enhance foam stability (Ibanoglu and Ibanoglu, 2000).

The extract exhibit a variety of pharmacological activities, including antiulcerogenic, anti-inflammatory, antispasmodic, antioxidative, antiallergic, antiviral, antidiabetic, antidepressive, hepatoprotective, expectorant, and memory enhancing activities (Wodjo et al., 2007; Fernandes et al., 2009; Dambolena et al., 2010). Although *G. glabra* contains a variety of substances, triterpene saponins and flavonoids are believed to be responsible for the bioactivities of licorice (Shams-Ardakani et al., 2007; Biondi et al., 2005). Glycyrrhizin (glycyrrhizin acid, GA), a sweet saponin obtained from the roots, is regarded as the major biologically-active principle of *G. glabra*. HPLC/UV is the official method for quality control

of licorice in the Chinese, Japanese, European and British Pharmacopoeias (Zhang and Ye, 2009).

Majority of the reports on HPLC analysis of licorice focused on the determination of glycyrrhizin acid either directly or indirectly after being hydrolyzed to glycyrrhetic acid (Sabbioni et al., 2006; Lauren et al., 2001). In Brazil, the official method for quality control of *G. glabra* roots and rhizomes employ previous acid hydrolysis of glycyrrhizin, extraction with dichloromethane, TLC development to obtain the chromatographic separation of the compounds, location and scrape of the hydrolyzed product (glycyrrhetic acid) from the plate followed by spectrophotometric analysis and comparison with standard glycyrrhetic acid absorbance (Brazilian Pharmacopeia, 2000).

In Brazilian ethnomedicine, *Periandra dulcis* (Syn.:*P. mediterranea* Taubert), popularly known as “licorice-of-the-earth” has been widely used as a cough suppressant. Anti-inflammatory, expectorant, diuretic and laxative activities have been reported to this plant (Suttisri et al., 1993). The roots of *P. dulcis* are also used as a substitute/adulterant of *G. glabra* in infections of the respiratory tract and for other commercial or medicinal purposes (Corrêa, 1984). Thread-like pieces of *P. dulcis* roots are commercially available in Brazil. A variety of sweet triterpene glycosides periandradulcins and periandrins were isolated from the roots among other triterpenoid glycosides (Suttisri et al., 1993; Ikeda et al., 1991). There is no method describing the quality control of *Periandra dulcis* roots in Brazil.

Considering the exploitation of *P. dulcis* as a substitute/adulterant of the original *G. glabra* in Brazil, the objectives of this study were: to evaluate and compare the antioxidant activities of both plants by two methods (TBARS and DPPH); to determine and compare the phenolic contents by Folin-Ciocalteu method; and to determine the relationship between antioxidant activity and phenolic compounds of the extracts to confirm that phenolic constituents are responsible for antioxidant activity of the two plants. Additionally, the

Brazilian Pharmacopoeia method to evaluate *G. glabra* roots was applied to both plants using a HPLC analysis instead of the use of spectrophotometric measurements, in order to compare the two HPLC profiles with the purpose to differentiate *P. dulcis* from *G. glabra*. Hence, this study presents the comparison between the antioxidant effects of crude extracts and fractions obtained from the roots of *G. glabra* and *P. dulcis* and the HPLC profile of these plants after the application of Brazilian Pharmacopoeia method. To the best of our knowledge, there were no reports in the literature comparing these plants intended for antioxidant activity and chromatographic profiles.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and reagents. Tris-HCl, thiobarbituric acid (TBA), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH), ascorbic acid, gallic acid, 18 β - glycyrrhetic acid (97%), Folin-Ciocalteu phenol reagent and malondialdehyde bis- (dimethyl acetal) (MDA) were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). Iron sulphate (Fe₂SO₄), phosphate buffer pH= 7.0, hydrochloridric and acetic acids were obtained from Merck (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). Acetonitrile HPLC grade was obtained from Tedia (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). Distilled deionised water (ddH₂O) was used throughout the experiments.

Plant Materials. Roots of *Periandra dulcis* were purchased from Santos Flora Trade in Herbal LTDA (Batch: Alcr 01/2008). *Glycyrrhiza glabra*, (roots and rhizomes), have been supplied by pharmaceutical Quimer Commercial LTDA (Batch: 009, Validity 02/2010).

Preparation of plant extracts for antioxidant property analysis and total phenolic content. The roots of the plants were powdered in a knife mill and were macerated separately at room temperature with ethanol 70% for a week with daily shake-up. After filtration, the

two extracts were evaporated under reduced pressure to remove the ethanol and 50 mL of each ethanolic extract was kipped to be test as crude extract. Remainder extracts were suspended in water and partitioned successively with dichloromethane, ethyl acetate and n-butanol (3 x 200 mL for each solvent).

DPPH assay. The antioxidant activity of the fractions and the crude extracts of the *P. dulcis* and *G. glabra* was evaluated by monitoring its ability in quenching the stable free radical DPPH, according to Schubert et al. (2007). Spectrophotometric analysis was used to measure the free radical scavenging capacity (RSC) and to determine the scavenging concentration or inhibitory concentration (IC₅₀). The DPPH quenching ability was expressed as IC₅₀. Six different ethanol dilutions of each fractions and crude extracts at 7.81 – 250 µg/mL were mixed with 1.0 mL of DPPH 0.3 mM in ethanol solution. After 30 minutes, the readings were made in spectrophotometer at 518nm. A solution of DPPH (1 mL; 0.3 mM) in ethanol (2.5 mL) was used as a negative control and ascorbic acid in the same concentrations used for the fractions and the crude extracts provide the positive control. The test was performed in triplicate and the calculation of the antioxidant activity followed the equation:

$$\%inibition = 100 - \frac{[(Abs_{sample} - Abs_{blank}) \times 100]}{Abs_{control}}$$

Where: Abs_{sample} is absorbance of each fraction; Abs_{blank} is absorbance of fractions without adding the DPPH; Abs_{control} is absorbance the solution of ethanol in DPPH. Tests were carried out in triplicate.

Lipid peroxidation inhibition (TBARS). TBARS production was determined as described by Ohkawa et al. (1975) in human blood plasma samples which were obtained from the Blood Bank of the Hospital of Federal University of Santa Maria. The project is included in the ethics committee of UFSM under number 23081.005770/2009-38. The samples were

collect using heparin as anticoagulant. Whole blood was centrifuged at 1000 rotations/min for ten min, and plasma was separated, removed by aspiration and frozen at -80°C until analysis. Aliquots of 500 µl of plasma were incubated for 1 h at 37 °C in a water bath with freshly prepared Fe₂SO₄ (10 µM) in the presence or absence of plant extracts in several concentrations (1 - 125 µg dried plant/mL). Color reaction was developed by adding 200 µl 8.1% SDS (sodium dodecyl sulphate) to the reaction mixture. This was subsequently followed by the addition of 500 µl of acetic acid/HCl (pH 3.4) mixture and 500 µl 0.6% thiobarbituric acid (TBA). This mixture was incubated at 100 °C for 1 h. Lipid peroxidation was estimated by measuring TBARS production in plasma at 532 nm. The absorbance was compared with the standard curve using malondialdehyde (MDA).

Folin-Ciocalteu reducing capacity assay. The total phenolic content of the extracts (or extract fractions) was determined spectrophotometrically using the Folin-Ciocalteu reagent, and was expressed as gallic acid equivalent (GAE) per g of each extract or fraction (Mahlke et al., 2009). The extract (1 mL of a 0.15 mg/mL) was mixed with 0.5 mL of 2 N Folin-Ciocalteu's reagent and this mixture was allowed to stand for 5 min before the addition of 2 mL of 20% Na₂CO₃. The absorbance was measured at 765 nm. The result was then referred to a calibration curve obtained with a similarly prepared set of different gallic acid concentrations (0,005 to 0,030 mg/mL).

Preparation of plant extracts as described by Brazilian Pharmacopoeia. Sample preparations were performed as described in the monograph of *Glycyrrhiza glabra* in the fourth edition of the Brazilian Pharmacopoeia (2000). In a few words, 1 g of each powdered drug was extracted separately with 25 mL of 1 M hydrochloric acid and 2.5 mL of dioxane, in round-bottomed flask. The mixture was kept under reflux for 2 h. After cooling, the material

was filtered throughout filter paper and the filtrate was discarded. The flask and the filter paper were washed with 5 portions of 20 mL of water, the water was discarded and the paper was dried at 105 °C for 20 min, and transferred to the flask by adding 50 mL of dichloromethane. The solution was boiled under reflux for 5 min and filtered into a new filter paper. The extraction procedure was repeated two times with 2 portions of 25 mL of dichloromethane and filtered through the same filter paper to the collector flask. The combined extracts were taking to dryness and the residue was diluted in equal parts of dichloromethane and methanol in to a 10 mL volumetric flask. Each solution was injected in the HPLC apparatus.

High performance liquid chromatography (HPLC-DAD) analysis. The liquid chromatography was a Shimadzu Prominence Auto Sample SIL-20A, equipped with four pumps LC-20AT linked to Degasser DGU-20A5, with detector to scan the ultraviolet spectrum of the photodiode array SPD-M20A integrator and CBM-20A. Chromatographic separation was accomplished using a Vertical C₁₈ reverse phase column (Vertical, 4.6 X 25 mm, 5 µm), monitored at 254 nm. The mobile phase was filtered through a 0.45 µm membrane filter and then degassed by an ultrasonic bath prior to use. All samples were first filtered through a 0.45 µm membrane filter (Millipore). HPLC was carried out in isocratic conditions using acetonitrile-phosphate buffer pH 7.0, (95:5, v/v) as mobile phase. The flow rate was 0.8 mL/min and the injection volume was 20 µl. DAD analyses were performed in the range between 200 and 700 nm, and the chromatographic peaks were confirmed by comparing their retention time and DAD-UV spectra with those of the reference standards at 254 nm. All chromatographic operations were carried out at ambient temperature and in triplicate.

Statistical analysis. The results are expressed as means \pm SD of at least three repetitions. Where appropriate, the analysis of variance (ANOVA) was used. The values $p < 0.05$ were regarded as significant. One-way ANOVA followed by Tukey test were performed in the total phenolics and DPPH assays.

RESULTS AND DISCUSSION

Phenolic contents and antioxidant activities. Herbs, spices, and other plant materials rich in phenolics are of increasing interest in the pharmaceutical and food industries, because they retard oxidative degradation of lipids and consequently improve the quality and/or nutritional value of the products. The equation obtained for the calibration curve of gallic acid was $Y = 11.969x - 0.0454$ ($r = 0.9984$). Total phenolic contents (TP) expressed in milligrams equivalent of gallic acid (GAE) per gram of crude extracts and fractions, and IC_{50} determinations by the DPPH method are given in Table 1. In *P. dulcis*, phenolic contents varied from 70.29 to 85.78 mg of GAE/g, while in *G. glabra* these values were wide-ranging from 83.26 to 137.7 mg of GAE/g. The TP values obtained from *G. glabra* were superior to the *Periandra dulcis* values and different from those obtained from other researchers working with *G. glabra* (Wojdylo et al., 2007). It is understandable that the TP content measured by Folin-Ciocalteu method does not give a full representation of the quantity of the phenolic constituents in the extracts and moreover the multiplicity of extractions procedures can lead to different results even working with the same plant (Wojdylo et al., 2007; Katsube et al., 2004; Tabart et al., 2009). However, the DPPH scavenging activity is helpful to the *in vitro* evaluation of extracts and fractions and its results can be connected to the presence of phenolic compounds, which contribute significantly to the total antioxidant capacity of medicinal plants (Rice-Evans et al., 1996; Surveswaran et al., 2007; Conforti et al., 2009). The smallest value of IC_{50} (the amount of extract of the plant tested necessary to decrease the

concentration of initial DPPH by 50%) obtained to *P. dulcis* was 325.01 ± 0.48 $\mu\text{g/mL}$ and it was related to the highest phenolic content verified in the dichloromethane fraction (Table 1). The results suggest that phenolic compounds present in the dichloromethane fraction of *P. dulcis* may be responsible for the capture of free radicals. The same picture was not seen with respect to *G. glabra*; the ethyl acetate fraction exhibits the higher phenolic content, but not the better IC_{50} value, which was obtained with the dichloromethane fraction, (34.37 ± 1.20 $\mu\text{g/mL}$), twofold of the IC_{50} of ascorbic acid, but on the other hand, corresponding to almost tenfold better than *P. dulcis* IC_{50} value (Table 1). In the same line, Visavadiya et al. (2009) reported very good antioxidant activities and DPPH IC_{50} values working with aqueous and ethanolic extracts of licorice ($\text{IC}_{50} = 43.6$ and 28.3 $\mu\text{g/mL}$, respectively). Comparing the overall results in Table 1, TP values between the two species don't differ as much, but the antioxidant activity of *G. glabra* tested by DPPH assay was clearly superior, indicating that the involved compounds which contribute to this activity may have structural differences among the two species.

The reaction of malondialdehyde (MDA) with thiobarbituric acid (TBA) to form a pink colored complex TBA-MDA that has an absorption maximum at 532 nm, is the basis of the commonest method used to assess lipid peroxidation in biological materials. The antioxidant efficiencies of the crude extract and the fractions from both plants were tested against Fe (II), a known prooxidant. Iron is an essential metal for normal physiology, but excess iron results in cell injury, because it can produce reactive oxygen species (ROS) which can cause damage to body cells (Meneghini, 1997). Free radical damage can be prevented by food rich in antioxidants such as fruit and vegetables. Fe (II)-induced TBARS production in blood was clearly decreased by the two plants. Figures 1 and 2 demonstrated the performance of each plant extract and fractions in modulate in vitro TBARS production. The IC_{50} obtained in the TBARS assay are given in Table 2. Considering these IC_{50} values, no significant

differences could be established between the two plants. However, when we examine Figures 1 and 2, the anti-lipid peroxidation activity of *P. dulcis* was slightly superior of *G. glabra*. Butanolic fraction, which shown the lowest IC₅₀ (1.38 µg/mL), at the second concentration tested (2 µg/mL) demonstrate 72.50% inhibition of peroxidation, reaching 97.50% at the final concentration of 125 µg/mL (Table 2, Figure 1).

Interestingly, dichloromethane fraction of *G. glabra* showed the lowest IC₅₀, but not the better performance in preventing TBARS production (Table 2 and Figure 2). Considering the different concentrations used in the assay, the crude extract of *G. glabra* evidently exhibits the better activity when compared with the other fractions profile. The roots of both plants tested here were effective inhibitors of TBARS production and also showed DPPH scavenger activity. These results may be related to the presence of terpenoids, flavonoids, and other polyphenols in these species. The *in vitro* antioxidant capacity of *G. glabra* extracts and the antioxidative effects of the isoflavan glabridin and other flavonoids derivatives isolated from licorice have been reported (Visavadiya et al., 2009; Visavadiya and Narasimhacharya, 2006; Wojcikowski et al., 2007; Belinky et al., 1998; Vaya et al., 1997). However, nothing is known about the compounds in *P. dulcis* that may be responsible for the antioxidant activities evidenced in this work and it is important to emphasize that the same fractions of *G. glabra* and *P. dulcis* produced dissimilar activities, demonstrating the presence of different compounds or different qualitative and quantitative compositions of their phenolic constituents. To our knowledge, there is no information available regarding *P. dulcis* antioxidant activities and phenolics quantification.

HPLC analysis. High performance liquid chromatography (HPLC) is a very useful tool which can be employ to characterize the chemical profile of medicinal plants extracts, to identify its main constituents or specific functional groups, to measure compounds of interest,

and to assure the quality control of crude extracts or manufactured products batch to batch, among other of not less important purposes (Drasar and Moravcova, 2004; Alaerts et al., 2007; Boligon et al., 2009; Sudati et al., 2009). The fourth edition of the Brazilian Pharmacopoeia affirm that dispensatory *Glycyrrhiza glabra* must contain at least 4% glycyrrhizic acid in the roots. The method is time-consuming and subject to numerous sources of error, based on a lot of steps to get the final result. The sample preparation procedure is complicated because there is a need to hydrolyze glycyrrhizin acid to get the aglycones, 18 α and 18 β -glycyrrhetic acids which are spectrophotometric measure at 254 nm. This TLC step is critical because without a previous chromatographic separation, spectrophotometric analysis is low specific and can be used only to determine the contents of total saponins. Figures 3 and 4 represents typical HPLC chromatograms of *G. glabra* and *P. dulcis* extracts respectively, and they agree well with six other samples (three for each plant, data not shown) obtained after the extraction procedures, followed by HPLC analysis instead of TLC/spectrophotometric measurements.

In Figure 3, it is possible to verify the presence of a peak at $R_t = 6.7$ min (not determined) and the peak at $R_t = 11.03$ min, which was related to 18 β -glycyrrhetic acid by comparison with the standard reference. In Figure 4, there were no peaks over $R_t = 5$ min. It could be seen that the chromatographic profiles differs as much and by comparison of the two chromatograms it is feasible to ascertain that glycyrrhetic acid, one of the main actives compounds of *G. glabra* is not present in *P. dulcis* roots. While detection of the peak of 18 β -glycyrrhetic in the chromatogram of *G. glabra* would indicate the presence of the active triterpenoidal saponins derived from glycyrrizin in the roots, the absence of this peak clearly indicate the adulteration of the material. It is important to emphasize that the method could be useful to detect adulteration, but it is not adequate to identify *P. dulcis* saponins, which lack chromophores and consequently, have no absorption at 254 nm.

The comparison of these two plants, with particular emphasis on antioxidant, polyphenol contents and HPLC profiles clearly indicate the differences existing among them. Although some of *P. dulcis* saponins are sweet, this physical-chemical property is not a guarantee that they have the same biological activities of *G. glabra* saponins. The potential changeability between these two species must be established at both, scientific and safe basis. More imperative concerns are regarded with the activities and properties of *G. glabra* what would be expected in pharmaceutical or confectionary formulations. From the analytical point of view, the Brazilian Pharmacopoeia method allow to guarantee the authenticity of *G. glabra* based on the presence of glycyrrhetic acid, but on the other hand there are still a lack between laboratory evidences and clinical efficacy and safe of *P. dulcis* remedies and the proofs about the *P. dulcis* pharmacological activities are up to now required.

To evaluate the therapeutic potential of *P. dulcis*, further studies aimed at the isolation and structural elucidation of constituents are needed. Thus, biological and toxicological studies with isolates indicate whether the popular use of *P. dulcis* is justified.

LITERATURE CITE

Alaerts G, Matthijs N, Smeyers-Verbeke J, Heyden YV 2007. Chromatographic fingerprint development for herbal extracts: A screening and optimization methodology on monolithic columns. *J Chromatogr A*. 1172: 1–8.

Belinky PA, Aviram M, Fuhrman B, Rosenblat M, Vaya J 1998. The antioxidative effects of the isoflavan glabridin on endogenous constituents of LDL during its oxidation. *Atherosclerosis* 137: 49-61.

Biondi DM, Rocco C, Ruberto G 2005. Dihydrostilbene derivatives from *Glycyrrhiza glabra* leaves. *J. Nat. Prod.* 68 (7): 1099-1102.

Boligon AA, Pereira RP, Feltrin AC, Machado MM, Janovik V, Rocha JBT, Athayde ML 2009. Antioxidant activities of flavonol derivatives from the leaves and stem bark of *Scutia buxifolia* Reiss. *Biores Technol.* 100: 6592-6598.

Brazilian Pharmacopoeia Commission 2000. Brazilian Pharmacopoeia, F.Bras IV Edition, São Paulo.

Conforti F, Sosa S, Marrelli M, Menichini F, Statti GA, Uzunov D, Tubaro A, Menichini F 2009. The protective ability of Mediterranean dietary plants against the oxidative damage: The role of radical oxygen species in inflammation and the polyphenol, flavonoid and sterol contents. *Food Chem.* 112: 587–594.

Corrêa MP 1984. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil. IBPF.

Dambolena JS, Zunino MP, Lucini EI, Olmedo R, Banchio E, Bima PJ, Zygadlo JA 2010. Total Phenolic Content, Radical Scavenging Properties, and Essential Oil Composition of *Origanum* Species from Different Populations. *J. Agric. Food Chem.* 58: 1115-1120.

Drašar P, Moravcova 2004. Recent advances in analysis of Chinese medicinal plants and traditional medicines. *J Chromatogr B.* 812: 3-21.

Fernandes A, Fernandes I, Cruz L, Matheus N, Cabral M, Freitas V 2009. Antioxidant and Biological Properties of Bioactive Phenolic Compounds from *Quercus suber* L. *J. Agric. Food Chem.* 57: 11154-11160.

Ibanoglu E, Ibanoglu S 2000. Foaming behaviour of liquorice (*Glycyrrhiza glabra*) extract. *Food Chem.* 70: 333-336.

Ikeda Y, Sugiura M, Fukaya C, Yokoyama K, Hashimoto Y, Kawanishi K, Moriyasu M 1991. Periandradulcins A, B and C: Phosphodiesterase inhibitors from *Periandra dulcis* Mart. *Chem Pharm Bull.* 39 (3): 566-571.

Katsube T, Tabata H, Ohta Y, Yamasaki Y, Anuurad E, Shiwaku K, Yamane Y 2004. Screening for antioxidant activity in edible plant products: Comparison of low-density lipoprotein oxidation assay, DPPH radical scavenging assay and Folin–Ciocalteu assay. *J. Agric. Food Chem.* 52: 2391–2396.

Kaur G, Alam MS, Jabbar Z, Javed K, Athar M 2006. Evaluation of antioxidant activity of *Cassia siamea* flowers. *J. Ethnopharmacol.* 108: 340-348.

Lauren DR, Jensen DJ, Douglas JA, Follett JM 2001. Efficient method for determining the glycyrrhizin content of fresh and dried roots, and root extracts, of *Glycyrrhiza* species. *Phytoch. Anal.* 12 (5): 332-335.

Mahlke JD, Boligon AA, Machado MM, Spader TB, Alves SH, Canto-Dorow TS, Athayde ML 2009. *In vitro* antimicrobial and antioxidant activities of a crude extract and fractions from *Buddleja thyrsoides* Lam. Leaves. *Quim. Nova.* 32: 277-281.

Meneghini R 1997. Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage. *Free Rad Biol Med.* 23: 783-792.

Mukhopadhyay M, Panja P, 2008. A novel process for extraction of natural sweetener from licorice (*Glycyrrhiza glabra*) roots. *Separation and Purification Technology.* 63: 539–545.

Ohkawa H, Ohishi H, Yagi K 1975. Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 95: 351-358.

Pourmorad F, Hosseinimehr SJ, Shahabimajd N 2006. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *Afr J Biotechnol.* 5: 1142-1145.

Rajeshwar Y, Kumar GPS, Grupta M, Mazunder VK 2005. Studies on *in vitro* antioxidant activities of methanol extract of *Mucuna pruriens* (Fabaceae) seeds. *Eur Bull Drug Res.* 13: 31-39.

Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad Biol Med.* 20: 933-956.

Sabbioni C, Ferranti A, Bugamelli F, Forti GC, Raggi, MA 2006. Simultaneous HPLC analysis, with isocratic elution, of glycyrrhizin and glycyrrhetic acid in liquorice roots and confectionery products. *Phytoch. Anal.* 17 (1): 25-31.

Schubert A, Pereira DF, Zanin FF, Alves SH, Beck RCR, Athayde ML 2007. Comparison of antioxidant activities and total polyphenolic and methylxanthine contents between the unripe fruit and leaves of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. *Pharmazie*, 62: 876-880.

Shams-Ardakani M, Mohagheghzadeh A, Ghannadi A, Barati A 2007. Formation of glycyrrhizin by *in vitro* cultures of *Glycyrrhiza glabra*. *Chem. Nat. Prod.* 3: 353-354.

Sudati JH, Fachinetto R, Pereira RP, Boligon AA, Athayde ML, Barbosa NBV, Rocha JBT 2009. In vitro antioxidant activity of *Valeriana officinalis* against different neurotoxic agents. *Neurochem Res.* 34: 1372–1379.

Surveswaran S, Cai YZ, Corke H, Sun M 2007. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food Chem.* 102: 938–953.

Suttisri R, Chung MS, Kinghorn AD, Sticher O, Hashimoto Y 1993. Periandrin V, a further sweet triterpene glycoside from *Periandra dulcis*. *Phytochemistry*, 34: 405-408.

Tabart J, Kevers C, Pincemail J, Defraigne J, Dommessa J 2009. Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chem.* 113: 1226–1233.

Vaya J, Belinky PA, Aviram M 1997. Antioxidant constituents from licorice roots: isolation, structure elucidation and antioxidative capacity toward LDL oxidation. *Free Rad Biol Med.* 23: 302-313.

Visavadiya NP, Soni B, Dalwadi N 2009. Evaluation of antioxidant and anti-atherogenic properties of *Glycyrrhiza glabra* root using *in vitro* models. *Int J Food Sci Nutr.* 60: 135-149.

Visavadiya NP, Narasimhacharya AVR 2006. Hypocholesterolaemic and antioxidant effects of *Glycyrrhiza glabra* (Linn) in rats. *Mol Nutr Food Res.* 50: 1080-1086.

Wojcikowski K, Stevenson L, Leach D, Wohlmuth H, Gobe G 2007. Antioxidant capacity of 55 medicinal herbs traditionally used to treat the urinary system: A comparison using a sequential three-solvent extraction process. *J Alternative Compl Med.* 13: 103-109.

Wojdylo A, Osmianski J, Czemerys R 2007. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chem.* 105: 940-949.

Zhang Q, Ye M 2009 Chemical analysis of the Chinese herbal medicine Gan-Cao (licorice). *J Chromatogr A.* 1216: 1954–1969.

Figure captions

Figure 1. Effects of different concentrations of crude extract, ethyl acetate, dichloromethane, and butanolic fractions from the roots of *P. dulcis* on Fe(II)-induced TBARS production in blood plasma.

Figure 2. Effects of different concentrations of crude extract, ethyl acetate, dichloromethane, and butanolic fractions from the roots of *G. glabra* on Fe(II)-induced TBARS production in blood plasma

Figure 3. HPLC profile *G. glabra*. Chromatographic conditions: Isocratic mode, acetonitrile-phosphate buffer pH 7.0 95:5, v/v as mobile phase, detection at 254 nm

Figure 4. HPLC profile of *P. dulcis*. Chromatographic conditions: isocratic mode, acetonitrile-phosphate buffer pH 7.0 95:5, v/v as mobile phase, detection at 254 nm.

Table 1- Total phenolic (TP) contents and antioxidant activities (IC₅₀/DPPH) of *P. dulcis* and *G. glabra*. Values represent the means and standard error from three replicates.

Table 2 – Calculated values of IC₅₀ (µg/mL) for crude extract and fractions from the roots of *Periandra dulcis* and *Glycyrrhiza glabra* in the TBARS assay. Values represent the means and standard error from three replicates.

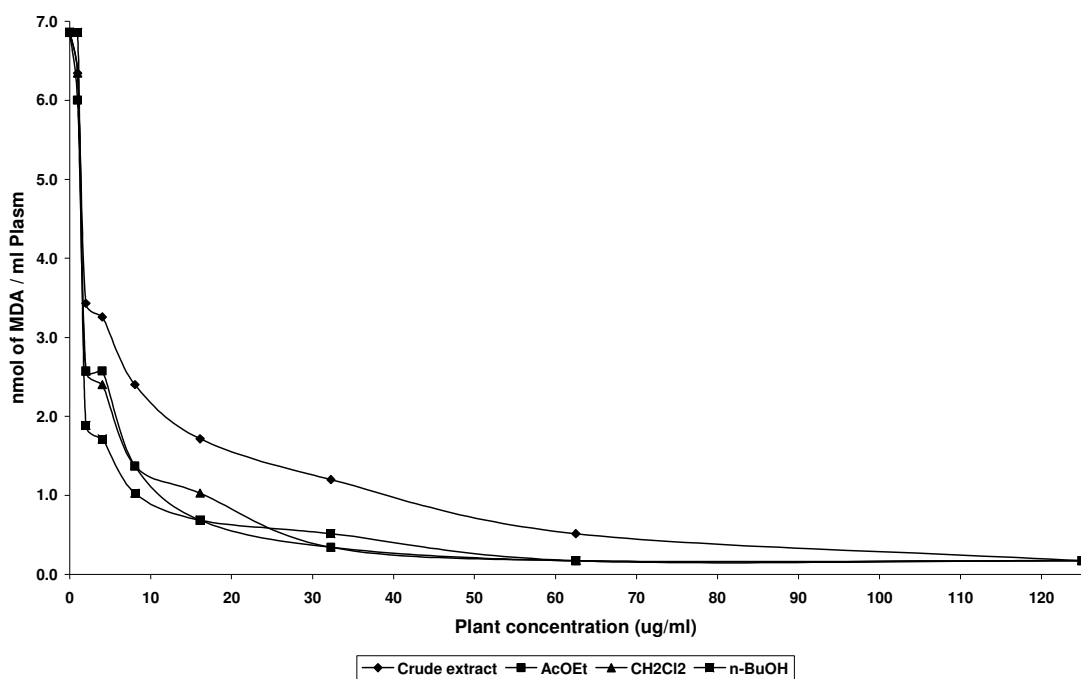


Figure 1. Effects of different concentrations of crude extract, ethyl acetate, dichloromethane, and butanolic fractions from the roots of *P. dulcis* on Fe(II)-induced TBARS production in blood plasma.

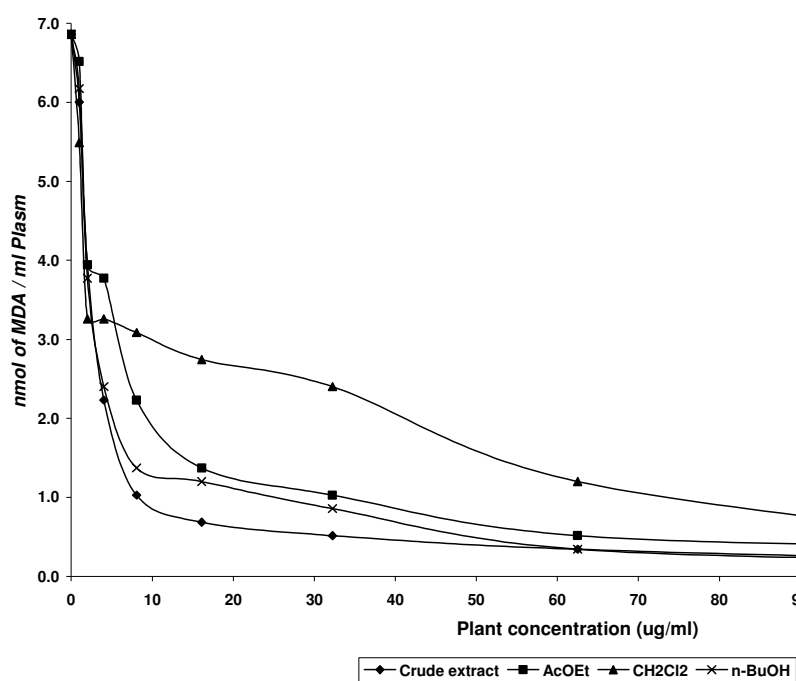


Figure 2. Effects of different concentrations of crude extract, ethyl acetate, dichloromethane, and butanolic fractions from the roots of *G. glabra* on Fe(II)-induced TBARS production in blood plasma.

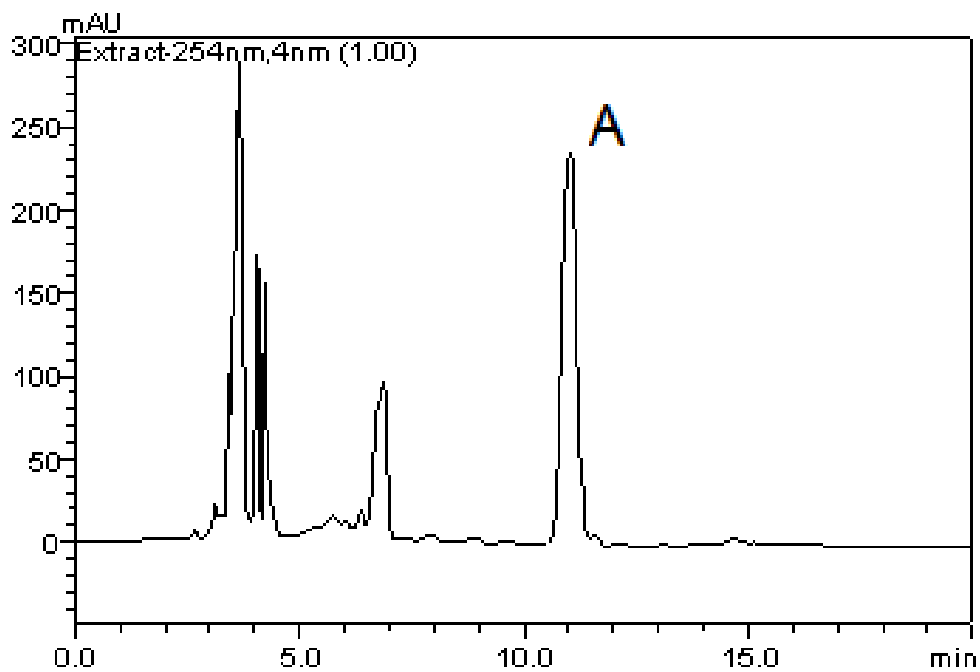


Figure 3. HPLC profile *G. glabra*. A) Glycyrrhetic acid. Chromatographic conditions: Isocratic mode, acetonitrile-phosphate buffer pH 7.0 95:5, v/v as mobile phase, detection at 254 nm.

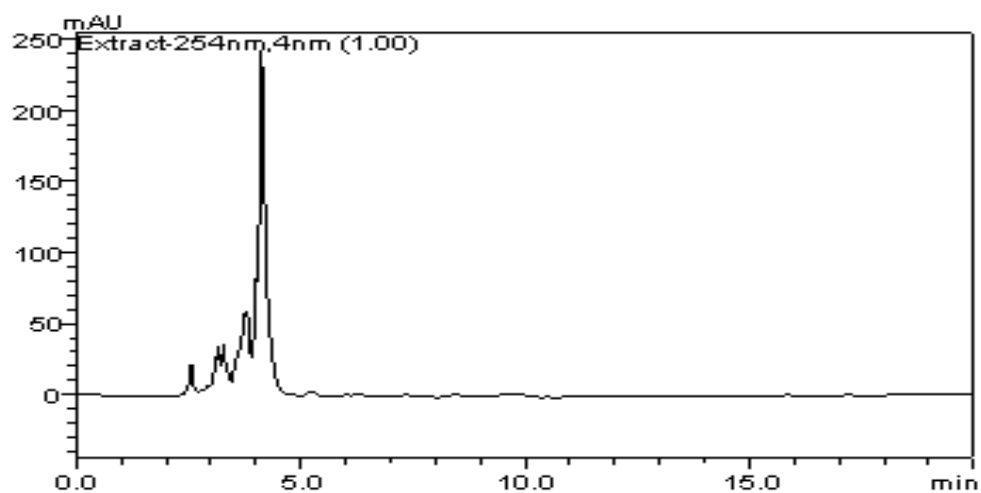


Figure 4. HPLC profile of *P. dulcis*. Chromatographic conditions: isocratic mode, acetonitrile-phosphate buffer pH 7.0 95:5, v/v as mobile phase, detection at 254nm.

Table 1- Total phenolic (TP) contents and antioxidant activities (IC₅₀/DPPH) of *P. dulcis* and *G. glabra*. Values represent the means and standard error from three replicates.

	<i>Periandra dulcis</i>		<i>Glycyrrhiza glabra</i>	
	TP ^a ± S.E. (mg /g)	IC ₅₀ (µg/ml)	TP ^a ± S.E. (mg /g)	IC ₅₀ (µg/ml)
Butanolic	77.36 ± 0.41a	1052.18 ± 0.58a	83.26 ± 2.71a	313.59 ± 0.27a
Ethyl acetate	75.13 ± 1.54a	616.67 ± 0.16b	137.7 ± 1,37b	105.14 ± 0.54b
Dichloromethane	85.78 ± 1.08b	325.01 ± 0.48c	104.84 ± 0.13c	34.37 ± 1.20c
Crude extract	70.29 ± 2.98a	1375.13 ± 0.95d	84.03 ± 0.54a	244.88 ± 0.65d
Ascorbic acid		15.98 ± 1.30		

^a TP expressed as GAE (mg/g fraction). S.E. = standard error. Averages followed by different letters in each column differ by Tukey test at p < 0.05.

Table 2 – Calculated values of IC₅₀ (µg/mL) for crude extract and fractions from the roots of *Periandra dulcis* and *Glycyrrhiza glabra* in the TBARS assay. Values represent the means and standard error from three replicates.

Plants	Extracts	IC ₅₀ ± S.E. (µg/ml)
<i>Periandra dulcis</i>	Butanolic	1.38 ± 1.22a
	Ethyl acetate	3.22 ± 0.97ab
	Dichloromethane	1.60 ± 0.86a
	Crude extract	3.85 ± 1.67ab
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Butanolic	2.23 ± 1.45ab
	Ethyl acetate	4.47 ± 1.33b
	Dichloromethane	1.91 ± 0.73a
	Crude extract	2.36 ± 0.98ab

Averages followed by different letters differ by Tukey test at $p < 0.05$

5.2 – Manuscrito 2. Comparative antimicrobial activity of *Glycyrrhiza glabra* and *Periandra dulcis*.

**Comparative antimicrobial activity of *Glycyrrhiza glabra* and
*Periandra dulcis***

Andrieli Cassel Feltrin¹, Tarcieli Pozzebon Venturini², Aline Augusti Boligon¹,
Janaina Frohlich¹, Vanessa Janovik¹, Sydney Hartz Alves², Margareth Linde
Athayde¹

¹- Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria.

²- Department of Clinical and Toxicological Analysis, Federal University of Santa
Maria

* To whom correspondence should be addressed. Tel.: +55 5532208950, Fax
+55 5532208248. e-mail address: margareth@smail.ufsm.br (M.L.Athayde)

ABSTRACT

Periandra dulcis is used in Brazil as a substitute of *Glycyrrhiza glabra* in infections of the respiratory tract. The study was conducted to compare the plants *P. dulcis* and *G. glabra* regarding antimicrobial activity, as well as to if verify the sub-division of fractions *P.dulcis* contributes to the improvement of the activity. Plants roots were ground and macerated using as solvent ethanol: water (70:30, v/v). Became fractionation of aqueous extracts with organic solvents of increasing polarity (CH₂Cl₂, EtOAc, n-BuOH). For the fractionation, the crude extract of *P. dulcis* was submitted to column chromatography on silica gel 60 using solvent mixtures with increasing polarity. We observed a similarity of two plants, with same result for bacteria and differing only for the fungi *Saccharomyces cerevisiae* and *Fusarium proliferatum*. *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Bacillus subtilis* were inhibited by both plants at the low concentration. The fractionation of *P.dulcis* improved MIC for *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella pullorum* and fungi, but decreased the MIC for *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*.

Key words: HPLC, MIC, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella pullorum*

INTRODUCTION

The increase in antimicrobial resistance in bacterial populations, especially of hospital origin, has been characterized as a public health problem (Ferronato *et al.*, 2007). The resistance problem became more serious due to difficulties in the discovery and launch of new antimicrobial agents on the market using the traditional method of screening, from fungi and bacteria, which has been making these products increasingly scarce and more expensive (Phelps, 1989).

Brazil has the greatest biodiversity on the planet, widely using and testing plants for many different purposes (Funari and Ferro, 2005). A search for new antimicrobials of plant origin should be prioritized due to the emergence of resistant microorganisms and opportunistic infections (Penna *et al.*, 2001).

Fabaceae is one of the largest botanical families, also known as Leguminosae, with wide geographic distribution. There are approximately 18000 species in over 650 genera. There are several reports in the literature indicating pronounced antimicrobial activity among the plants of this family (Jantová *et al.*, 2000; Agnese *et al.*, 2001; Salvat *et al.*, 2004; Almeida *et al.*, 2006). The species *Periandra dulcis* and *Glycyrrhiza glabra* are included in the Fabaceae family (Roncal *et al.*, 2006).

Glycyrrhiza glabra, popularly known as licorice, is used in bronchitis, cough and hoarseness. Wang and Yang, in 2007, quantified terpenes and flavonoids of this plant by high performance liquid chromatography. In 2003, Ates and Erdogru investigated the antimicrobial activity of *G. glabra* and its fractions. Root extracts showed various antibacterial activities (7-11 mm/20 µl inhibition zone) against the microorganisms tested.

Periandra dulcis is native to Brazil, common in central states, but difficult to culture in the coastal regions (Corrêa, 1984). *P. dulcis* is used as a substitute for *G. glabra* in infections of the respiratory tract. However, no reports in the literature comparing these plants for antimicrobial activity.

In this study, we performed in vitro tests for evaluating the antimicrobial activity of roots of these plants.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material

Periandra dulcis was obtained in the form of roots through Santosflora Trade in Herbal LTDA. *Glycyrrhiza glabra*, in the form of roots, was obtained by Quimer Commercial LTDA.

Chemicals

Silica Gel 60, Silica Gel 60 GF₂₅₄ coated plates, solvents for the extractions, dichloromethane, ethyl acetate, ethanol, methanol, *n*-butanol, BHI, RPMI and DMSO were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Silica Gel Merck 70-230 mesh was used for column chromatography.

Microorganisms tested

For the screening antimicrobial, the bacteria used are *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27893, *Escherichia coli* ATCC 5922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Salmonella pullorum* ATCC 9120, *Bacillus subtilis* (clinical isolates) and *Micrococcus spp.*(clinical isolates); the fungus *Candida albicans* ATCC 44373, *Cryptococcus neoformans* ATCC 28952, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 2601, *Aspergillus flavus* ATCC 2384, *Sporothrix schenckii* (clinical

isolates) and *Fusarium proliferatum* (clinical isolates); and the algae *Prototheca zopfii* (clinical isolates).

ANTIMICROBIAL ACTIVITY

Sample preparation and extraction

The parts of the plants were powdered in a knife mill. The powders of roots were macerated separately at room temperature with ethanol 70% for a week with daily shake-up. After filtration, the two extracts were evaporated under reduced pressure to remove the ethanol. Each extract was partitioned successively with dichloromethane, ethyl acetate and n-butanol (3 x 200 mL for each solvent). Aqueous extract taken to dryness led to the crude extract.

Phytochemical avaluation and identification of active substances from the crude extract of *P. dulcis*

The crude extract of *Periandra dulcis* (2,4 g) was submitted to column chromatography on silica gel 60 using initially CH₂Cl₂: hexane (50:50) as mobile phase. Afterward the column was eluted with binary mixture of increase polarity by increasing in 10% of dichloromethane untill 100%, after CH₂Cl₂:AcOET(90:10), increasing in 10% untill AcOET 100%, and AcOEt:MeOH (90:10), increasing in 10% untill MeOH 100%.

At the end of this procedure, we obtained 100 vials of ± 50 mL. After evaluating chromatographic plate, add the vials like in 12 sub-fractions that were subjected to antimicrobial evaluation and characterization by HPLC.

Antimicrobial activity

For an initial screening, the use of plant extracts (crude extract, dichloromethane, ethyl acetate and n-butanol) diluted in DMSO in the concentration range of 2000-15.625 µg/mL. For the sub-fractions of *P. dulcis*, we use a range of concentrations of 3000-100 µg/mL, as the yield of each sub-fraction.

It was necessary to make a 1:50 dilution in RPMI broth (for fungi) and BHI (for bacteria) from the initial concentration received, because the solvent DMSO is very toxic to the microorganisms tested and could mask the results. The plates were incubated at 35 °C for 48 hours and interpretation of results was achieved through the display of turbidity on the multiplication of the pathogen, compared to controls positive and negative, with the lowest concentration able to produce inhibition of growth of bacteria or fungus, for the cavity positive control, one identified as the MIC (Minimum Inhibitory Concentration) of the fraction to the agent studied. All tests were performed in duplicate.

The determination of liability was made by the documents as the CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).

RESULTS AND DISCUSSION

The results of antimicrobial screening of plants *P. dulcis* and *G. glabra* are expressed in the table 1.

Table 1- Minimum inhibitory concentration of *G. glabra* and *P. dulcis*

Microorganisms	Plants Extracts ($\mu\text{g/mL}$)							
	<i>G. glabra</i>				<i>P. dulcis</i>			
	Crude Extract	CH_2Cl_2	EtOAc	N-butanol	Crude Extract	CH_2Cl_2	EtOAc	N-butanol
Sa	250	>2000	250	250	250	>2000	250	250
Pa	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
Ec	15,625	15,625	15,625	15,625	15,625	15,625	15,625	15,625
Kp	15,625	15,625	15,625	15,625	15,625	15,625	15,625	15,625
Sp	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
Bs	15,625	15,625	15,625	15,625	15,625	15,625	15,625	15,625
Ca	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
Cn	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
Sc	500	>2000	>2000	>2000	>2000	500	>2000	>2000
Af	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
Ss	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
Fp	>2000	500	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
Pz	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000

*Sa= *Staphylococcus aureus*, Pa=*Pseudomonas aeruginosa*, Ec= *Escherichia coli*, Kp= *Klebsiella pneumoniae*, Sp= *Salmonella pullorum*, Bs= *Bacillus subtilis*, Ca= *Candida albicans*, Cn= *Cryptococcus neoformans*, Sc= *Saccharomyces cerevisiae*, Af= *Aspergillus flavus*, Ss= *Sporothrix schenckii*, Fp= *Fusarium proliferatum*, Pz= *Prototheca zopfii*.

We can verify that the results from the plants were very similar. The only differences were found for fungi *Saccharomyces cerevisiae* and *Fusarium proliferatum*, where liquorice fraction showed activity in the crude extract and dichloromethane, respectively, and *P. dulcis* in dichloromethane fraction only for *Saccharomyces cerevisiae*.

Glycyrrhizinic acid, the glycoside form of glycyrrhetic acid, is a triterpenoid compound which accounts for the sweet taste of licorice root, and it is the main constituent of *G. glabra* (Shamsa *et al.*, 2007). The mechanism of antimicrobial

action of glycyrrhetic acid, by inhibiting the DNA, RNA and proteins, was elucidated by Kim *et al.*, 2002. The activity in vitro anti-*Helicobacter pylori* was tested with extract of *G. glabra*, glycyrrhizinic acid, glycyrrhetic acid and derivatives. The glycyrrhetic acid has shown to be promising in the treatment of gastric ulcers caused by *H. pylori* (Krausse *et al.*, 2004).

The roots of *Periandra dulcis* were described by Machado (1941) to contain 0.38% of glycyrrhizinic acid, main terpene found in licorice (Kim *et al.*, 2002). However, Hashimoto *et al.* (1980) have found no evidence of this acid in the plant.

In another study from our group unpublished data, we performed HPLC to differentiate these plants for the presence of 18 β -glycyrrhetic acid, obtained by hydrolysis of glycyrrhizin acid. We can check the peak 18 β -glycyrrhetic acid at 11.3 min in B, and the absence of this peak in A. This suggests that the glycyrrhizinic acid is not present in the roots of *P. dulcis*.

Kim *et al.*, 2002 found that 18 β -glycyrrhetic acid have an antibacterial activity of 7.6 and 12.5 $\mu\text{g/mL}$ against *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus epidermidis* without causing hemolysis of human erythrocytes, whereas it was not inhibitory against *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* and various fungi. Confocal microscopy showed that 18 β -glycyrrhetic acid was located within the bacteria but had not caused membrane disruption. It then inhibited synthesis of DNA, RNA and protein. Thus, we can suggest that glycyrrhetic acid contributes to the antimicrobial activity of *G. glabra*.

Suttisri *et al.* (2003) presented the structure of periandrins I to V, triterpenic isolated from *P.dulcis* and structurally similar to glycyrrhizin acid (figure 1). The structure of periandrinas I to IV were elucidated by Hashimoto *et al.*, in studies conducted in the years 1980-82. Periandrina V was elucidated by Suttisri *et al.*, 1993.

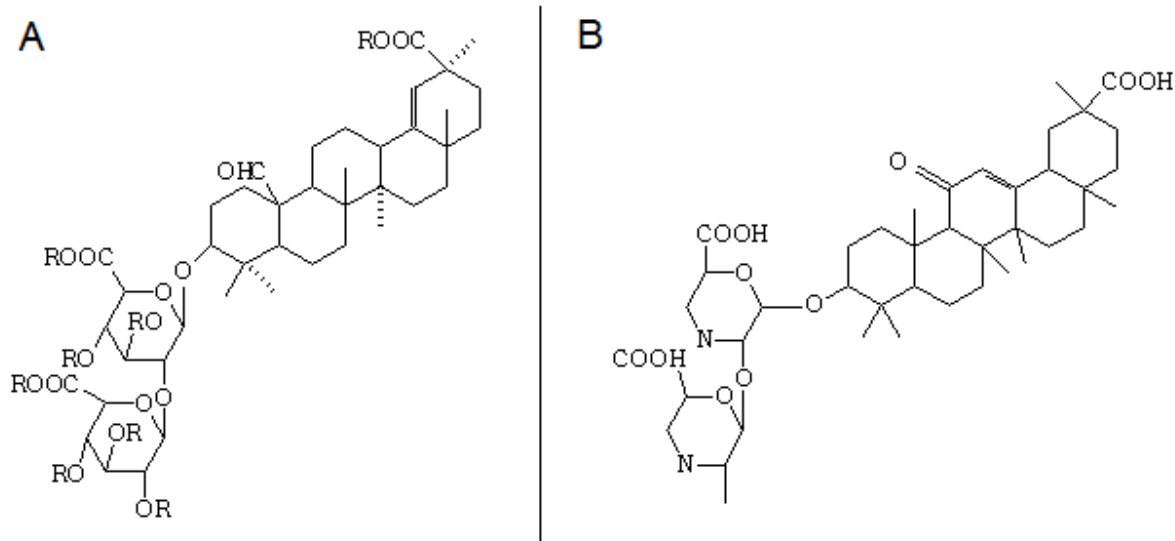


Figure 1. Molecular structure of: A) nucleus perandrins; B) glycyrrhinic acid.

Table 2, presents the results of minimum inhibitory concentration sub-fractions of *P. dulcis*. We observed that more apolar fractions showed better antimicrobial activity. Several authors identified the presence of compounds triterpenic (as perandrins) in more apolar fractions (Madureira *et al.*, 2004; Bringe *et al.*, 2006; Bagalwa and Chifundera, 2007; Marín *et al.*, 2008; Rhourri-Frich *et al.*, 2009). Triterpenes are known for several biological activities, among which the antimicrobial activity (Virtuoso *et al.*, 2005). Thus, perandrins possibly contribute to the activity presented by *P. dulcis*.

Table 2- Minimum inhibitory concentration of sub-fractions of *P. dulcis*

Microorganism	Sub-fractions of <i>P. dulcis</i> ($\mu\text{g/mL}$)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Sa	274	248	290	1052	2098	360	568	1227	605	827,5	357	1510
Pa	274	248	290	1052	2098	360	568	1227	605	827,5	357	1510
Ec	274	248	290	1052	2098	360	568	1227	605	827,5	357	1510
Kp	274	248	290	1052	2098	360	568	1227	605	827,5	357	1510
Sp	274	248	290	1052	2098	360	568	1227	605	827,5	357	1510
Bs	274	248	290	1052	2098	360	568	1227	605	827,5	357	1510
Ca	137	124	145	526	1048	180	284	613,5	302,5	1655	178,5	755
Cn	137	124	145	526	1048	180	284	613,5	302,5	1655	178,5	755
Sc	137	124	145	526	1048	180	284	613,5	302,5	1655	178,5	755
Af	137	124	145	526	1048	180	284	613,5	302,5	1655	178,5	755
Ss	137	124	145	526	1048	180	284	613,5	302,5	1655	178,5	755
Fp	137	124	145	526	1048	180	284	613,5	302,5	1655	178,5	755
Pz	137	124	145	526	1048	180	284	613,5	302,5	1655	178,5	755

*Sa= *Staphylococcus aureus*, Pa= *Pseudomonas aeruginosa*, Ec= *Escherichia coli*, Kp= *Klebsiella pneumoniae*, Sp= *Salmonella pullorum*, Mc= *Micrococcus spp*, Ca= *Candida albicans*, Cn= *Cryptococcus neoformans*, Sc= *Saccharomyces cerevisiae*, Af= *Aspergillus flavus*, Ss= *Sporothrix schenckii*, Fp= *Fusarium proliferatum*, Pz= *Prototheca zopfii*.

Comparing the results of tables 1 and 2, we observed that the sub-fractionation of *P. dulcis* contributes significantly to the antibacterial activity for *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella pullorum*. However, the activity against bacteria *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* decreases considerably, making us to believe that various substances in the crude extract may have synergistic effects against these bacteria.

CONCLUSION

The tested plant extracts have shown great similarity for antimicrobial activity. *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Bacillus subtilis* were inhibited by both plants at the low concentration. The presence of periandrinas, triterpenes such as glycyrrhetic acid of *G. glabra*, in *P. dulcis* can explain this result.

The fractionation of *P. dulcis* contributed in a limited way for the antibacterial activity and extensively for the antifungal. The sub-fractions of *P. dulcis* allowed the inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella pullorum*. However, the fractionation increased the MIC, reducing inhibition of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*.

The results suggest that the popular use of *P. dulcis* and *G. glabra* to microbial infections can be substantiated. However, phytotherapy with *P. dulcis* is not recommended. Studies that elucidate the mechanism of action and toxicity of the plant are needed to assess the therapeutic potential.

BIBLIOGRAPHY

AGNESE, A. M.; PÉREZ, C.; CABRERA, J. L. *Adesmia algiceras*: antimicrobial activity and chemical study. *Phytomedicine*, v. 5, nº 8, pp. 389-394, 2001.

ALMEIDA, J. R. G. S.; SILVA-FILHO, R. N.; NUNES, X. P.; DIAS, C. S., PEREIRA, F. O.; LIMA, E. O. Antimicrobial activity of the essential oil of *Bowdichia virgiloides* Kunt. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, nº 16, pp. 638-641, 2006.

ATES, D. A.; ERDOGRUL, O. T. Antimicrobial Activities of Various Medicinal and Commercial Plant Extracts. *Turkish Journal of Biology*, nº 27, pp. 157-162, 2003.

BAGALWA, M.; CHIFUNDERA K. Environmental impact evaluation of the stem bark extract of *Maesa lanceolata* used in Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 114, nº3, pp. 281-284, 2007.

BRINGE, K.; SCHUMACHER, C. F. A.; SCHMITZ-EIBERGER, M.; STEINER, U.; OERKE, E. C. Ontogenetic variation in chemical and physical characteristics of adaxial apple leaf surfaces. *Phytochemistry*, v. 67, nº 2, pp.161-170, 2006.

CORRÊA, M.P. Dicionário de Plantas Úteis do Brasil, IBPF. 1984.

FELTRIN, A. C.; BOLIGON, A. A.; FROHLICH, J.; MACHADO, M. M.; JANOVIK, V.; ATHAYDE, M. L. Comparative antioxidant activity and HPLC profiles of *Periandra dulcis* and *Glycyrrhiza glabra*. *Impress.*

FERRONATTO, R.; MARCHESAN, E. D.; PEZENTI, E.; BEDNARSKI, F.; ONOFRE, S. B. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 17, nº 2, pp. 224-230, 2007.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, nº 15, pp. 178-182, 2005.

HASHIMOTO, Y.; ISHIZONE, H.; OGURA, M. Periandrin II and IV, triterpene glycosides from *Periandra dulcis*. *Phytochemistry*, v. 19, pp. 2411-2415, 1980.

HASHIMOTO, Y.; ISHIZONE, H.; SUGANUMA, M.; OGURA, M.; NAKATSU, K.; YOSHIOKA, H. Periandrin I, a sweet triterpene-glycoside from *Periandra dulcis*. *Phytochemistry*, v. 22, n. 1, pp. 259-264, 1983.

HASHIMOTO, Y.; OHTA, Y.; ISHIZONE, H.; KURIYAMA, M.; OGURA, M. Periandrin III, a novel sweet triterpene glycoside from *Periandra dulcis*. *Phytochemistry*, v. 21, n. 9, pp. 2335-2337, 1982.

JANTOVÁ, S.; NAGY, M.; RUZEKOVA, L.; GRANCAI, D. Antibacterial activity of plant extracts from the families Fabaceae, Oleaceae, Philadelphaceae, Rosaceae and Staphyleaceae. *Phytotherapy Research*, v. 8, nº 14, pp. 601-603, 2000.

KIM, H. K.; PARK, Y.; KIM, H. N.; CHOI, B. H.; JEONG, H.G.; LEE, D. G.; HAHM, K. S. Antimicrobial mechanism of β -glycyrrhetic acid isolated from licorice, *Glycyrrhiza glabra*. *Biotechnology Letters*, nº 24, pp. 1899-1902, 2002.

KRAUSSE, R.; BIELENBERG, J.; BLASCHEK AND, W.; ULLMANN, U. In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of *Extractum liquiritiae*, glycyrrhizin and its metabolites. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, nº 54, pp. 243–246, 2004.

MACHADO, A. Estudo químico do alcaçuz brasileiro (*Periandra dulcis* Martius). *Revista da Sociedade Brasileira de Química*, v. 10, pp. 101-103, 1941.

MADUREIRA, A. M.; DUARTE, M. T.; PIEDADE, M. F. M.; ASCENSO, J. R.; FERREIRA, M. J. U. Isoprenoid compounds from *Euphorbia portlandica*. X-ray structure of lupeportlandol, a new lupane triterpene. *Journal of Brazilian Chemical Society*, v. 15, nº 5, 2004.

MARÍN, R. M.; PORTO, R. M. O.; ALARCÓN, A. B.; LAVÍN, A. N. V. Caracterización por Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas del Extracto Apolar de las Hojas de *Clusia minor* L. Latin American Journal of Pharmacy, v. 27, nº 5, pp. 747-751, 2008.

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, pp. 37-40, 2001.

PHELPS, C. E. Bug/drug resistance: sometimes less is more. Medical care, v. 27, pp. 194-203, 1989.

RHOURLI-FRICH, B.; CHAIMBAULT, P.; CLAUDE, B.; LAMY, C.; ANDRÉ P.; LAFOSSE, M. Analysis of pentacyclic triterpenes by LC-MS. A comparative study between APCI and APPI. Journal of Mass Spectrometry, nº 44, pp. 71-80, 2009.

RONCAL, J.; FISHER, J. B.; FELLOWS, M. Q. N.; WENDELBERGER, K. S.; MASCHINSKI, J.; FIDELIBUS, M. W. Propagation protocol of the *Endangered Crenulate Lead Plant Amorpha herbacea var. crenulata*. Native Plants Journal, v. 7, nº 1, pp. 89-93, 2006.

SALVAT, A.; ANTONACCI, L.; FORTUNATO, R. H.; SUAREZ, E. Y.; GODOY, H. M. Antimicrobial activity in methanolic extracts of several plant species from northern Argentina. Phytomedicine, v. 2-3, nº 11, pp. 230-234, 2004.

SHAMSA, F.; SOURI, E.; SHARIFZADEH, M.; JALALIZADEH, H., FARZAMI, P. Determination of Glycyrrhetic Acid in Rat Plasma by HPLC After Oral Administration of Licorice Aqueous Extract. Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 3, nº 1, pp. 51-56, 2007.

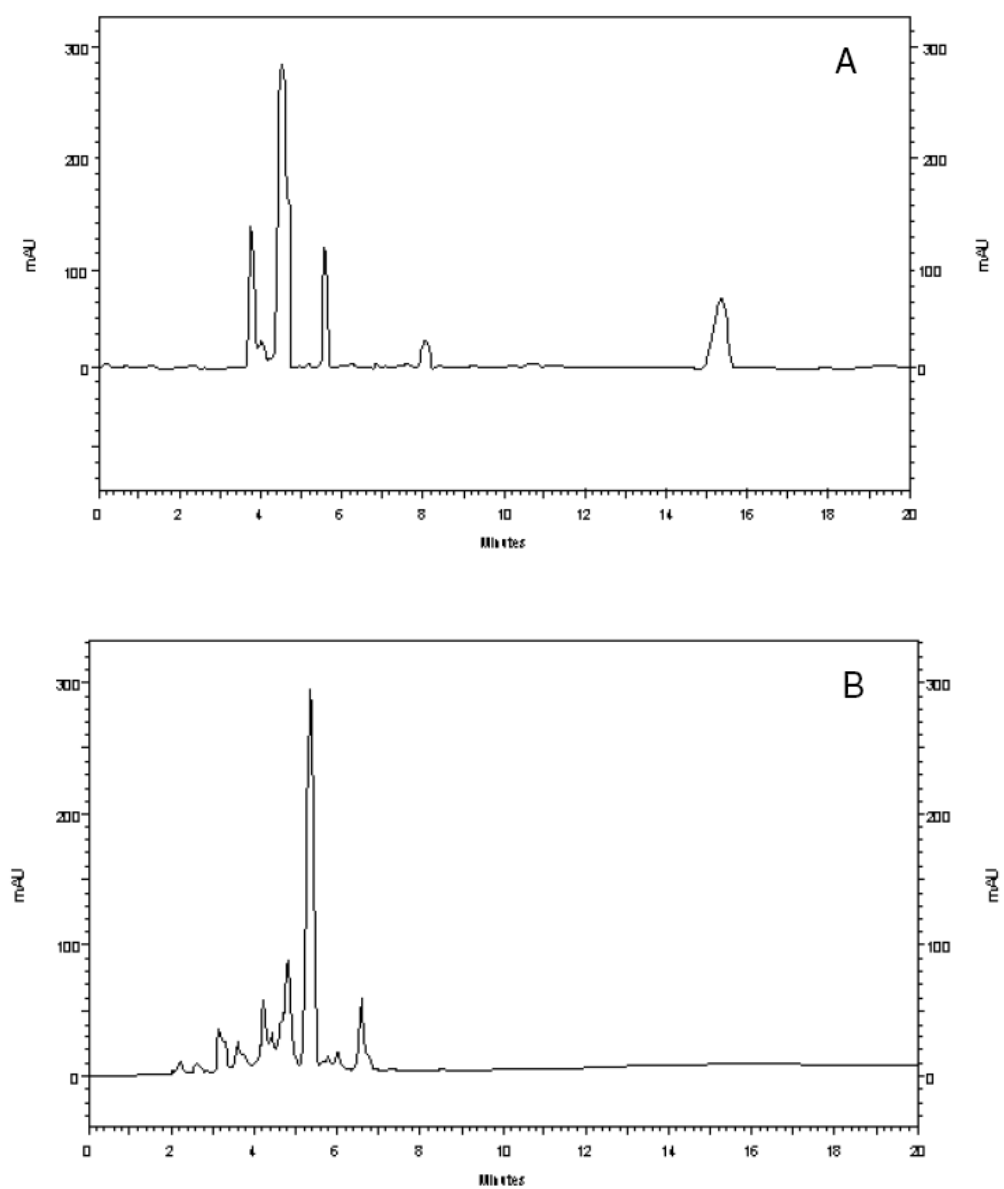
SUTTISRI, R.;CHUNG, M.S.;KINGHORN, A.D.; STICHER, O.;HASHIMOTO, Y. Periandrin V, a further sweet triterpene glycoside from *Periandra dulcis*. *Phytochemistry*, v. 34, nº 2, pp. 405-408, 1993.

VIRTUOSO, S.; DAVET, A.; DIAS, J. F. G.; CUNICO, M. M.; MIGUEL, M. D.; OLIVEIRA, A. B.; MIGUEL, O. G. Estudo preliminar da atividade antibacteriana das cascas de *Erythrina velutina* Willd., Fabaceae (Leguminosae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 15, nº 2, pp. 137-124, 2005.

WANG, Y. C.; YANG, Y. S. Simultaneous quantification of flavonoids and triterpenoids in licorice using HPLC. *Journal of Chromatography B*, v. 850, pp. 392–399, 2007.

5.3 – Resultados adicionais

As sub-frações resultantes do fracionamento em coluna cromatográfica em sílica gel 60 foram avaliadas por CLAE. Os cromatogramas das frações mais ativas, 1 a 3, podem ser visualizados na figura 8.



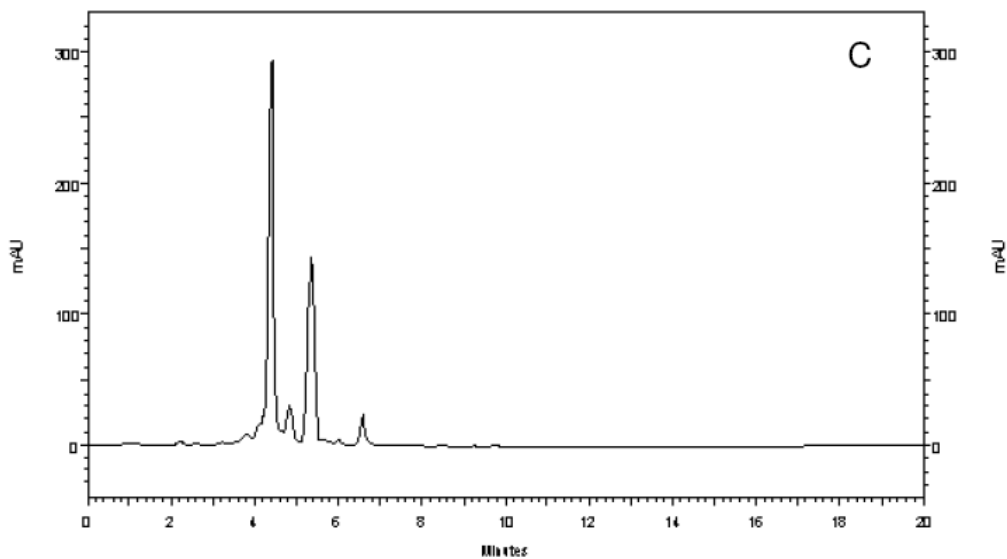


Figura 8 - Perfil por CLAE das sub-frações 1 (A), 2 (B) e 3 (C) de *P. dulcis*. Condições cromatográficas: modo isocrático, acetonitrila-tampão fosfato pH 7.0, 95:5 v/v como fase móvel, detecção em 254nm.

No cromatograma da sub-fração 1, verificamos a presença de 4 picos majoritários em 3.78, 4.5, 5.9 e 15.3 minutos. O maior pico está em 4.5 min, seguido pelo pico em 5.9 min. O pico em 15.3 min é verificado apenas nesta fração. Os cromatogramas das sub-frações 2 e 3 mostram picos com tempo de retenção idênticos em 4.8, 5.3 e 6.6 min. Um pequena variação do tempo de retenção é verificado no primeiro pico das frações 2 e 3, 4.2 e 4.4 min, respectivamente. Contudo, os componentes majoritários das sub-frações 2 e 3 não correspondem a mesma substância.

6 DISCUSSÃO

A busca por novos fármacos tem possibilitado a renovação da pesquisa com plantas medicinais. Laboratórios de empresas farmacêuticas investem em estudos visando o isolamento de substâncias que conferem propriedades medicinais às plantas, incrementando o mercado de fitoterápicos e fitofármacos.

O uso popular de *Periandra dulcis* como substituto de *Glycyrrhiza glabra* requer embasamento científico. No entanto, a falta de estudos químicos sobre *P. dulcis* impossibilita conclusões sobre a sua utilização, motivando o presente trabalho que descreve o estudo comparativo entre *G. glabra* e *P. dulcis*.

Para uma avaliação preliminar dos compostos das plantas, foi realizada CCD com os extratos brutos. A revelação com anisaldeído e a visualização em luz ultravioleta não revelou compostos em comum entre as plantas. Na busca por compostos frequentemente encontrados na família Fabaceae, realizou-se CCD com padrões disponíveis no Laboratório de Farmacognosia. No entanto, não foi possível localizar a presença de rutina, quercetina, lupeol, β -sitosterol, ácido ursólico, ácido clorogênico, ácido cafeico e cumarinas no extrato bruto e frações de *P. dulcis*.

Radicais livres, como as espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs), são conhecidos como os grandes responsáveis pelo envelhecimento e doenças degenerativas, como o câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais (NETZEL *et al.*, 2007; VALKO *et al.*, 2007). Os principais EROs são divididos em radiculares: hidroxila (HO^\bullet), superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peroxila (ROO^\bullet) e alcoxila (RO^\bullet); e os não-radicalares: oxigênio, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso. Dentre as ERNs o óxido nítrico (NO^\bullet), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos (ONOO^-). Alguns radicais podem reagir com lipídios, proteínas e DNA, enquanto outros são reativos apenas com lipídios (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1986; VISIOLI *et al.*, 2000; GÜLCIN *et al.*, 2003).

Os compostos fenólicos das plantas são importantes antioxidantes naturais. A estrutura química de fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonóides, taninos, lignanas e ligninas, favorecem a neutralização dos radicais livres e a

quelação dos metais de transição. A presença do anel aromático contribui para estabilizar os intermediários formados pela ação dos fenóis (BALASUNDRAM *et al.*, 2006; SOUSA *et al.*, 2007).

Conhecendo a atividade antioxidante de *G. glabra*, buscou-se elucidar o perfil antioxidante de *P. dulcis*. Para uma possível comparação, realizou-se o ensaio com o radical DPPH, o doseamento de polifenóis com o reagente de Folin-Ciocalteu e o ensaio de TBARS utilizando os extratos brutos e frações de ambas as plantas.

O ensaio do radical DPPH determina a capacidade redutora dos compostos presentes na planta. O DPPH é um radical de coloração violeta com um próton livre que, na presença de compostos captadores de prótons, passa a coloração amarela (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995; HUANG *et al.*, 2005). A metodologia utilizada seguiu Choi *et al.*, 2002. As frações diclorometano de *P. dulcis* e *G. glabra* apresentaram os melhores resultados, com IC₅₀ (concentração necessária para inibir a atividade oxidante em 50%) de $325,01 \pm 0,48$ e $34,37 \pm 1,2$ µg/mL, respectivamente. As frações menos ativas são extrato bruto em *P. dulcis* ($1375,13 \pm 0,95$ µg/mL) e butanólica ($313,59 \pm 0,27$) em *G. glabra*. A fração mais ativa em *P. dulcis* tem resultado semelhante à fração menos ativa em *G. glabra*. Desta forma, fica nítida a superioridade de *G. glabra* sobre *P. dulcis* no ensaio do radical DPPH. No entanto, a baixa seletividade da reação não permite elucidar quais compostos de atividade antioxidante estão em maior quantidade em *G. glabra* (ARTS *et al.*, 2004).

O doseamento de polifenóis utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu foi realizado conforme metodologia descrita por Chandra e Mejia (2004). O ácido gálico foi usado como padrão de referência e confecção da curva de calibração. Os resultados são expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama da fração testada. Neste ensaio, os polifenóis formam um complexo de coloração azul, quantificado por espectrofotometria, na presença do reativo de Folin-Ciocalteu. Taninos não são dosados por esta reação (VERZA *et al.*, 2007).

A maior concentração de compostos fenólicos de *P. dulcis* é encontrada na fração diclorometano ($85,78 \pm 1,08$ mg/g). As demais frações da planta demonstraram conteúdo de polifenóis próximos. Em *G. glabra*, os compostos fenólicos estão mais concentrados na fração acetato de etila, seguido da fração diclorometano, $137,7 \pm 1,37$ e $104,84 \pm 0,13$ mg/g, respectivamente.

O malondialdeído (MDA) é um indicador da ação dos radicais livres no organismo, estando em níveis elevados em algumas doenças associadas ao

estresse oxidativo. Desta forma, a quantificação do MDA em sistemas biológicos serve como parâmetro de avaliação do estresse oxidativo celular e da peroxidação lipídica. A reação do MDA com o ácido tiobarbitúrico (TBA) resulta em um produto detectado por espectrofotometria (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; STEGHENS *et al.*, 2001; SIM *et al.*, 2003).

O excesso de Fe (II), um conhecido pró-oxidante, geralmente é regulado por mecanismos endógenos. Contudo, a falha de algum mecanismo de neutralização do Fe (II) pode levar à produção de EROs e doenças relacionadas (GOETZ e LUCH, 2008). Para verificarmos a atividade antioxidante *in vivo* das plantas, adotou-se a metodologia do TBARS induzido por Fe (II) em plasma humano.

A fração butanólica de *P. dulcis* apresentou a melhor atividade ($1,38 \pm 1,22$ $\mu\text{g/mL}$), seguida da fração diclorometano ($1,60 \pm 0,86$ $\mu\text{g/mL}$). As frações acetato de etila e extrato bruto demonstraram atividades semelhantes, $3,22 \pm 0,97$ e $3,85 \pm 1,67$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Observando a figura 2 do artigo 4.1, verificamos que a fração butanólica provoca o maior decaimento dos níveis de TBARS, confirmando o resultado do IC_{50} .

Para *G. glabra*, a fração diclorometano apresentou a melhor inibição dos níveis de TBARS, $1,91 \pm 0,73$ $\mu\text{g/mL}$, seguida das frações butanólica e extrato bruto, $2,23 \pm 1,45$ e $2,36 \pm 0,98$ $\mu\text{g/mL}$. A fração acetato de etila demonstrou a menor atividade, com $4,47 \pm 1,33$ $\mu\text{g/mL}$. Contudo, ao observarmos a figura 1 do artigo 4.1, nota-se que a fração diclorometano, com o melhor IC_{50} , não corresponde ao melhor perfil de decaimento dos níveis de TBARS. Graficamente, o extrato bruto demonstrou maior decaimento, seguido da fração butanólica e acetato de etila.

Nos resultados dos testes de atividade antioxidante e conteúdo de polifenóis, a fração diclorometano de *P. dulcis* demonstrou ser mais eficiente nas reações redox, justificado pela maior quantidade de polifenóis. Contudo, a fração butanólica mostrou melhor capacidade de quelação de Fe (II). Em *G. glabra*, não foi possível estabelecer uma relação, já que as frações obtiveram resultados controversos nos testes, sugerindo que diversos compostos contribuem para a atividade antioxidante da planta.

A 4ª edição da Farmacopéia Brasileira dispõe de monografia para *G. glabra*. O teste quali/quantitativo baseia-se na hidrólise do ácido glicirrizínico, dando origem as agliconas 18α e 18β -ácido glicirretínico, que podem ser dosado por método espectrofotométrico. A planta deve conter no mínimo 4% de ácido glicirrizínico nas

raízes. Machado, em 1941, verificou a presença de 0,38% de ácido glicirrizínico em *P. dulcis*.

Para confirmarmos a presença do ácido glicirrizínico em *P. dulcis*, utilizamos a metodologia proposta pela Farmacopéia Brasileira para *G. glabra*. As amostras obtidas em triplicata pela extração foram analisadas por CLAE. Na figura 3 do artigo 4.1, verificamos a presença de um pico, correspondente ao ácido glicirretínico, entre 10 e 15 minutos. Este pico não está presente na figura 4. A ausência de ácido glicirretínico em *P. dulcis* também foi relatado por Hashimoto *et al.* (1980).

A molécula do ácido glicirretínico possui grupo cromóforo carbonila no anel aromático que permite a visualização da molécula em 254 nm. As moléculas das periandrininas possuem apenas uma dupla ligação no anel aromático, não sendo suficiente para absorção em 254 nm. Portanto, na figura 4, a localização das periandrininas não está evidente.

O método farmacopeico, apesar de ser extenso, foi eficaz para a determinação do ácido glicirrizínico em *G. glabra* e na detecção de possíveis adulterações. A utilização do CLAE contribuiu para o método, permitindo a quantificação do ácido glicirretínico sem usarmos placas cromatográficas preparativas com posterior extração, que pode ocasionar erros experimentais. Contudo, a metodologia não deve ser usada para identificarmos as saponinas de *P. dulcis*.

Através do convênio entre os Laboratórios de Farmacognosia e de Análises Clínicas e Toxicológicas, pesquisamos plantas com atividade antimicrobiana. A aluna Tarcieli Pozzebon Venturini, sob a orientação do Professor Doutor Sydney Hartz Alves, analisou os extratos das plantas quanto à atividade antimicrobiana. As plantas obtiveram resultados semelhantes, variando apenas para *Saccharomyces cerevisiae* e *Fusarium proliferatum*.

Na tentativa de identificarmos a substância mais ativa contra microorganismos, realizamos o sub-fracionamento do extrato bruto de *P. dulcis*. Solventes de polaridade crescente (fase móvel) foram adicionados à coluna cromatográfica de sílica gel (fase estacionária). As 12 sub-frações resultantes foram submetidas à análise antimicrobiana. A tabela 2 do artigo 4.2 demonstra que as frações mais apolares são mais efetivas contra os microorganismos testados.

A diferença entre as sub-frações de *P. dulcis*, demonstrada nos perfis cromatográficos, sugere que compostos diversos podem contribuir para a atividade

antimicrobiana da planta. Contudo, não foi possível identificarmos quais as substâncias correspondem aos picos encontrados.

A semelhança na atividade antimicrobiana entre as plantas requer trabalhos futuros. O isolamento de substâncias de *P. dulcis* por técnicas cromatográficas e a elucidação estrutural usando ^{13}C -RMN são de fundamental importância para avaliarmos o potencial terapêutico da planta.

7 CONCLUSÕES

- A fração diclorometano e a fração acetato de etila apresentaram maior quantidade de compostos fenólicos em *P. dulcis* e *G. glabra*, respectivamente, utilizando o método do reagente de Folin-Ciocalteu.
- A maior atividade antioxidante, usando o método do DPPH, foi encontrada para a fração diclorometano em ambas as plantas.
- *Glycyrrhiza glabra* demonstrou resultados superiores à *Periandra dulcis* nos testes do radical livre DPPH e no reagente de Folin-Ciocalteu.
- A fração butanólica de *P. dulcis* apresentou a melhor inibição dos índices de TBARS. Em *G. glabra*, a fração diclorometano apresentou melhor IC₅₀, mas o melhor perfil de decaimento dos níveis de TBARS foi encontrado no extrato bruto.
- *Periandra dulcis* foi superior à *Glycyrrhiza glabra* no ensaio do TBARS.
- *Periandra dulcis* demonstrou perfil cromatográfico diferente de *Glycyrrhiza glabra*. Não foi encontrado indícios da presença do ácido glicirretínico em *P. dulcis*. O método da Farmacopéia Brasileira permite a identificação de *G. glabra* e indica falsificação. Contudo, não permite a identificação da planta adulterante.
- As plantas obtiveram resultado semelhante frente aos microorganismos testados. *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Bacillus subtilis* foram inibidos na mínima concentração testada por ambas as plantas.
- O sub-fracionamento de *P. dulcis* aumentou a atividade contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella pullorum*.

As plantas demonstraram atividade antimicrobiana semelhante e atividade antioxidante satisfatória. *P. dulcis* mostrou ter potencial para estudos farmacológicos. Contudo, a CCD e os cromatogramas obtidos por CLAE deixam nítida que a composição de *P. dulcis* e *G. glabra* não é a mesma. Portanto, o uso de *P. dulcis* como substituta de *G. glabra* na etnomedicina brasileira não pode ser recomendado. Para isto, estudos posteriores com *P. dulcis* são necessários para garantir a segurança e eficácia do seu uso como fitoterápico.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, N. D. C. *et al.* Avaliação da adequação técnica de indústrias de medicamentos fitoterápicos e oficinais do Estado do Rio de Janeiro. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 13, p. 745-753, 2008.

AOKI, F. *et al.* Determination of glabridin in human plasma by solid-phase extraction and LC-MS/MS. **Journal of Chromatography B**, v. 828, n. 1-2, p. 70-74, 2005.

ARIAS-CASTRO, C.; SCRAGG, A. H.; RODRIGUEZ-MENDIOLA, M. A. The effect of cultural conditions on the accumulation of formononetin by suspension cultures of *Glycyrrhiza glabra*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 34, p. 63-70, 1993.

ARTS, M. J. *et al.* Antioxidant capacity of reaction products limits the applicability of the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) assay. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, n. 1, p. 45-49, 2004.

ASGARY, S. *et al.* Effect of *Glycyrrhiza glabra* extract on aorta wall atherosclerotic lesion in hypercholesterolemic rabbits. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 6, n. 4, p. 313-317, 2007.

ATES, D. A.; ERDOGRUL, O. T. Antimicrobial activities of various medicinal , and commercial plant extracts. **Turkish Journal of Biology**, v. 27, p. 157-162, 2003.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191-203, 2006.

BIONDO, E.; MIOTTO, S. T. S.; WITTMANN, M. T. S. Citogenética de espécies arbóreas da subfamília Caesalpinioideae - Leguminosae do sul do Brasil. **Ciência Florestal**, v. 15, p. 241-248, 2005.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT- Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRITTO, K. B.; NOBLICK, L. R.; BRITTO, I. C. Plantas com atributos antiasmáticos. **Sitientibus**, v. 1, n. 2, p. 7-19, 1983.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal Medical Biology Research**, v. 33, p. 179-189, 2000.

CARVALHO, A. C. B. *et al.* Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 314-319, 2008.

CHANDRA, S.; MEJIA, E.G. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 3583-3589, 2004.

CHIN, Y. W. *et al.* Anti-oxidant constituents of the roots and stolons of licorice (*Glycyrrhiza glabra*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 12, p. 4691-4697, 2007.

CHOI, C. W. *et al.* Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant Science**, v. 153, p.1161-1168, 2002.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil**. IBDF. 1984.

COWAN, M. M. Plants products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Review**, v. 12, p. 564-582, 1999.

DANTAS, I. C.; GUIMARÃES, F. R. Plantas medicinais comercializadas no município de Campina Grande, PB. **Revista de Biologia e Farmácia**, v. 1, n. 1, 2007.

DHINGRA, D.; SHARMA, A. Antidepressant-like activity of *Glycyrrhiza glabra* L. in mouse models of immobility tests. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 30, p. 449-454, 2006.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4ª edição, Editora Atheneu, São Paulo, **1988**.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FILHO, V. C.; YUNES, R. A. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

FUKAI, T. *et al.* Anti- *Helicobacter pylori* flavonoids from licorice extract. **Life Sciences**, v. 71, p. 1449-1463, 2002.

FUKAI, T. *et al.* Antimicrobial activity of licorice flavonoids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Fitoterapia**, v. 73, p. 536-539, 2002.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 178-182, 2005.

FUNCH, L. S.; BARROSO, G. M. Revisão taxonômica do gênero *Periandra* Mart. ex Benth. (Leguminosae, Papilionoideae, Phaseoleae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 22, n. 3, p. 339-356, 1999.

GARCIA, E. S. Biodiversity, biotechnology and health. **Caderno de Saúde Pública**, v. 11, n. 3, p. 495-500, 1995.

GOETZ, M. E.; LUCH, A. Reactive species: A cell damaging route assisting to chemical carcinogens. **Cancer Letters**, in press, 2008.

GOLDBERG, G. S. *et al.* Evidence that disruption of connexon particle arrangements in gap junction plaques is associated with inhibition of gap junctional communication by a glycyrrhetic acid derivative. **Experimental Cell Research**, v. 222, n. 1, p. 48-53, 1996.

GÜLCIN, I. *et al.* Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L) seed extracts. **Food Chemistry**, v. 83, p. 371-382, 2003.

GUPTA, V. K. *et al.* Antimicrobial potential of *Glycyrrhiza glabra* roots. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p. 377-380, 2008.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 246, p. 501-514, 1986.

HARAGUCHI, H. *et al.* Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhiza inata*. **Phytochemistry**, v. 48, p. 125-129, 1998.

HARAGUCHI, H. *et al.* Protection of mitochondrial functions against oxidative stresses by isoflavans from *Glycyrrhiza glabra*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 52, n. 2, p. 219-223, 2000.

HASHIMOTO, Y.; ISHIZONE, H.; OGURA, M. Periandrin II and IV, triterpene glycosides from *Periandra dulcis*. **Phytochemistry**, v. 19, p. 2411-2415, 1980.

HASHIMOTO, Y. *et al.* Periandrin III, a novel sweet triterpene glycoside from *Periandra dulcis*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 9, p. 2335-2337, 1982.

HASHIMOTO, Y. *et al.* Periandrin I, a sweet triterpene-glycoside from *Periandra dulcis*. **Phytochemistry**, v. 22, n. 1, p. 259-264, 1983.

HASHIMOTO, Y. *et al.* Triterpenes from *Periandra dulcis* roots. **Phytochemistry**, v. 23, n. 3, p. 1807-1808, 1984.

HAYASHI, H. *et al.* Organ specific localization of flavonoids in *Glycyrrhiza glabra* L. **Plant Science**, v. 116, n. 2, p. 233-238, 1996.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1841-1856, 2005.

IKEDA, Y. *et al.* Periandrulcins A, B and C: Phosphodiesterase inhibitors from *Periandra dulcis* Mart. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 39, n. 3, p. 566-571, 1991.

INOUE, H. *et al.* Modulation by glycyrrhetic acid derivatives of TPA-induced mouse ear oedema. **British Journal of Pharmacology**, v. 96, n. 1, p. 204-210, 1989.

IONKOVA, I. Optimization of flavonoid production in cell cultures of *Astragalus missouriensis* Nutt. (Fabaceae). **Pharmacognosy Magazine**, v. 5, n. 18, p. 92-97, 2009.

JI, H. F.; LI, X. J.; ZHANG, H. Y. Natural products and drug discovery. **European Molecular Biology Organization**, v. 10, n. 3, p. 194-200, 2009.

KELLY, J. P. *et al.* Recent trends in use of herbal and other natural products. **Archives of Internal Medicine**, v. 165, p. 281-286, 2005.

KIM, H. K. *et al.* Antimicrobial mechanism of β -glycyrrhetic acid isolated from licorice, *Glycyrrhiza glabra*. **Biotechnology Letters**, v. 24, n. 22, 2002.

KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Natural Reviews Drug Discovery**, v. 4, p. 206-220, 2005.

LOURENZANI, A. E. B. S.; LOURENZANI, W. L.; BATALHA, M. O. Barreiras e oportunidades na comercialização de plantas medicinais provenientes da agricultura familiar. **Informações Econômicas**, v. 34, n. 3, p. 15-25, 2004.

MACHADO, A. Estudo químico do alcaçuz brasileiro (*Periandra dulcis* Martius). **Revista da Sociedade Brasileira de Química**, v. 10, p. 101-103, 1941.

MACIEL, M. A. M. *et al.* Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MASTACHE, J. M. N.; SOTO, C.; DELGADO, G. Antioxidant evaluation of *Eysenhardtia* species (Fabaceae): relay synthesis of 3-*O*- acetyl-11, 12 α -epoxy-oleanan-28, 13 β -olide isolated from *E. platycarpa* and its protective effect in experimental diabetes. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, p. 1503-1510, 2007.

MISHIMA, M. *et al.* Promotion of nasal absorption of insulin by glycyrrhetic acid derivatives. **Journal of Pharmacobiodyn**, v. 12, n. 1, p. 31-36, 1989.

MIYAGAWA, N. *et al.* Anti-inflammatory activities of Brazilian licorice (*Periandra mediterranea*) extract. **Journal of Traditional Medicines**, v. 21, n. 3, p. 130-136, 2004.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.

MORAES, M. E. A.; SANTANA, G. S. M. Aroeira-do-sertão: um candidato promissor para o tratamento de úlceras gástricas. **Revista da Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico**, v. 3, p. 5-6, 2001.

MOTSEI, M. L. *et al.* Screening of traditionally used South African plants for antifungal activity against *Candida albicans*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 86, n. 2-3, p. 235-241, 2003.

NETZEL, M. *et al.* Cancer cell antiproliferation activity and metabolism of black carrot anthocyanins. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 8, p. 364-372, 2007.

OBOLENTSEVA, G. V. *et al.* Pharmacological and therapeutic properties of licorice preparations (a review). **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 33, p. 24-31, 1999.

OKADA, K. *et al.* Identification of antimicrobial and antioxidant constituents from licorice of Russian and Xinjiang origin. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 37, p. 2528-2530, 1989.

OLIVEIRA, F.; SAITO, M. L. Alguns vegetais brasileiros empregados no tratamento da diabetes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 2-3-4, p. 170-196, 1989.

OLIVEIRA, A. N.; QUEIROZ, M. S. M.; RAMOS, M. B. P. Estudo morfológico de frutos e sementes de Tefrósia (*Tephrosia candica* DC. - Papilionoideae) na Amazônia Central. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 22, n. 2, p. 193-199, 2000.

OLUKOGA, A.; DONALDSON, D. Historical perspectives on health. The history of liquorice: the plant, its extract, cultivation and commercialisation and etymology. **Journal of Royal Society for Public Health**, v. 188, p. 300-304, 1998.

PATWARDHAN, B.; VAIDYA, S. D. B.; CHORGHADE, M. Ayurveda and natural products drug discovery. **Current Science**, v. 86, n. 6, p. 789-799, 2004.

PEREIRA, B. M. R. *et al.* Anti-inflammatory and immunologically active polysaccharides of *Periandra mediterranea*. **Phytochemistry**, v. 54, n. 4, p. 409-413, 2000.

PERIANDRA DULCIS. Disponível em: <
<http://www.naturenetwork.com.br/images/alcacuz.jpg>>, acessado em 15/07/2010.

PINTO, A. C. *et al.* Current status challenges and trends on natural products in Brazil. **Química Nova**, v. 25, p. 45-61, 2002.

PIVATTO, M. *et al.* Electrospray ionization mass spectrometry of piperidine alkaloids from *Senna spectabilis* (Fabaceae) extracts: fast identification of new constituents and co-metabolites. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6B, p. 1431-1438, 2005.

QUEIROZ, A. C. *et al.* The antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Piptadenia stipulacea* Benth. (Fabaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.128, n. 2, p. 377-383, 2010.

RATHI, S. G. *et al.* In-vitro cytotoxic screening of *Glycyrrhiza glabra* L. (Fabaceae): A natural anticancer drug. **Journal of Young Pharmacists**, v. 1, n. 3, p. 239-243, 2009.

SANTOS, W. R. *et al.* Haemolytic activities of plant sponins and adjuvants. Effect of *Periandra mediterranea* saponin on the humoral response to the FML antigen of *Leishmania donovani*. **Vaccine**, v. 15, n. 9, p. 1024-1029, 1997.

SATO, J. *et al.* Antifungal activity of plant extracts against *Arthrrium sacchari* and *Chaetomium funicola*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 90, n. 4, p. 442-446, 2000.

SHIMOYAMA, Y. *et al.* Effects of glycyrrhetic acid derivatives on hepatic and renal 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase activities in rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 55, n. 6, p. 811-817, 2010.

SILVA, L. L. S. *et al.* Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de *Dioclea grandiflora* Mart. ex. Benth., Fabaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n. 20, v. 2, p. 208-214, 2010.

SILVA, V. C. *et al.* Constituintes fenólicos e terpenóides isolados das raízes de *Andira froxinifolia* (Fabaceae). **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1184-1186, 2006.

SIM, A. S. *et al.* Improved method for plasma malondialdehyde measurement by high-performance liquid chromatography using methyl malondialdehyde as an internal standard. **Journal of Chromatography B**, v. 785, p. 337-344, 2003.

SOUSA, C. M. M. *et al.* Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

STEGHENS, J. P. *et al.* Diaminonaphtalene, a new highly specific reagent for HPLC-UV measurement of total and free malondialdehyde in human plasma or serum. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, n. 2, p. 242-249, 2001.

SUTTISRI, R. *et al.* Periandrin V, a further sweet triterpene glycoside from *Periandra dulcis*. **Phytochemistry**, v. 34, p. 405-408, 1993.

TAVA, A. *et al.* Volatile compounds from leaves and flowers of *Bituminaria bituminosa* (L.) Stirt. (Fabaceae) from Italy. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 22, n. 5, p. 363-370, 2007.

TOLEDO, A. C. O. *et al.* Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lectra**, v. 21, n. 1/2, p. 7-13, 2003.

VALKO, M. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VAYA, J.; BELINKY, P. A.; AVIRAM, M. Antioxidant constituents from licorice roots: isolation, structure elucidation and antioxidative capacity toward LDL oxidation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 23, n. 2, p. 302-313, 1997.

VERZA, S. G. *et al.* Avaliação das variáveis analíticas do método de Folin-Ciocalteu para determinação do teor de taninos utilizando como modelo o extrato aquoso de folhas de *Psidium guajava* L. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 815-820, 2007.

VIBHA, J. B. *et al.* A study on pharmacokinetics and therapeutic efficacy of *Glycyrrhiza glabra*: a miracle medicinal herb. **Botany Research International**, v. 2, n. 3, p. 157-163, 2009.

VIRTUOSO, S. **Estudo fitoquímico e biológico das cascas de *Erythrina velutina* Willd. - Fabaceae (Leguminosae - Papilionoideae)**. 2005. 124f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

VISAVADIYA, N. P.; NARASIMHACHARVA, A. V. R. L. Hypocholesterolaemic and antioxidant effects of *Glycyrrhiza glabra* (Linn) in rats. **Molecular Nutrition e Food Research**, v. 50, n. 11, p. 1080-1086, 2006.

VISIOLI, F.; KEANEY, F. F. Jr., HALLIWELL, B. Antioxidants and cardiovascular disease; panaceas or tonics for tired sheep? **Cardiovascular Research**, v. 47, n. 3, p. 409, 2000.

WANG, Z. Y. Anticarcinogenesis of licorice and its major triterpenoid constituents. **Food Phytochemicals for Cancer Prevention II**, v. 33, p. 329-334, 1994.

YOKOTA, T. *et al.* The inhibitory effect of glabridin from licorice extracts on melanogenesis and inflammation. **Pigment Cell Research**

YU, X. Q. *et al.* In vitro and in vivo neuroprotective effect and mechanisms of glabridin, a major active isoflavan from *Glycyrrhiza glabra* (licorice). **Life Sciences**, v. 82, n. 1-2, p. 68-78, 2008.