

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
INSTITUTO DA SAÚDE
CURSO DE FARMÁCIA

Sheila Prescendo Albara

QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS NAS
FOLHAS DE *Humulus lupulus* L. (Lúpulo)

Passo Fundo

2022

Sheila Prescendo Albara

QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS NAS
FOLHAS DE *Humulus lupulus* L. (Lúpulo)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Farmácia do Instituto da Saúde da Universidade de Passo Fundo, como requisito parcial para obtenção do título de Farmacêutico, sob orientação da Profa. Dr. Andréa Michel Sobottka.

Passo Fundo

2022

QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS NAS FOLHAS
DE *Humulus lupulus* L. (Lúpulo)

Por:

Sheila Prescendo Albara

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado em 13 de dezembro de 2022

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Andréa Michel Sobottka

(orientadora)

Profa. Dra. Miriam Teresinha Knorst

Profa. Dra. Fabiana Tonial

Passo Fundo

2022

RESUMO

O lúpulo é uma planta do gênero *Humulus* que pertence à família *Cannabaceae*. Existem três espécies de plantas do gênero *Humulus*, que são o *Humulus lupulus* L., *H. japonicus* e *H. yunnanensis* Hu. O lúpulo sempre foi cultivado na Alemanha e Estados Unidos, visto que estes locais teriam condições adequadas para o cultivo. No Brasil o mesmo começou recentemente a ser cultivado com o objetivo de se estabelecer uma autossuficiência na produção, pois o mesmo é bastante utilizado na indústria cervejeira. Além disso tem sido relatado alguns efeitos biológicos da planta, com destaque para o efeito anti-inflamatório, antioxidante, antimicrobiano e também a influência sob a síndrome metabólica. Uma vez que na indústria cervejeira são utilizadas as flores do lúpulo e as folhas são descartadas, neste trabalho foram avaliados justamente estas folhas. Sabe-se que o lúpulo contém compostos fenólicos, que são substâncias do metabolismo secundário das plantas com reconhecida atividade biológica. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo quantificar compostos fenólicos em extrato etanólico das folhas de *Humulus lupulus* variedade Columbus, pelo método de Folin-Ciocalteu. Os resultados foram expressos em miligramas equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama de extrato seco, sendo que o extrato das folhas de lúpulo apresentou 29,25 mg EAG g⁻¹. Na literatura, estudos com os cones da planta mostram um conteúdo de fenólicos maior do que nas folhas. No entanto, os resultados evidenciaram que as folhas também podem ser fonte de compostos de interesse farmacológico. Destacam-se as variações que podem ocorrer nos resultados finais em função de fatores ambientais e de diferenças na preparação dos extratos.

Palavras-chave: Folin-Ciocalteu. Lúpulo. Metabólitos secundários.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	05
2 OBJETIVOS.....	06
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	06
3.1 História do Lúpulo.....	06
3.2 Características botânicas.....	07
3.3 Compostos presentes no lúpulo.....	09
3.4 Principais efeitos biológicos do lúpulo.....	09
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
4.1 Material vegetal.....	11
4.2 Preparação dos extratos e determinação do conteúdo de fenólicos	12
4.3 Curva padrão de ácido gálico.....	13
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	14
6 CONCLUSÃO.....	17
REFERÊNCIAS.....	17

1 INTRODUÇÃO

Lúpulo é o nome popular de plantas do gênero *Humulus* pertencentes à família *Cannabaceae*. Existem três espécies de plantas do gênero *Humulus*, que são o *Humulus lupulus* L., *H. japonicus* e *H. yunnanensis* Hu. O outro gênero da família é a *Cannabis*, representada exclusivamente por *C. sativa* (cânhamo indiano, maconha ou haxixe). As inflorescências da planta fêmea do Lúpulo formam os cones, secretores de lupulina, responsáveis pelo aroma e amargor da cerveja, os quais são muito utilizados, sendo mais comum a utilização da espécie *Humulus lupulus* L. na indústria cervejeira (ALMAGUER *et al.*, 2014). A lupulina é um pó amarelado que contém resinas, polifenóis e óleos essenciais, substâncias de interesse para a indústria cervejeira (DURELLO; SILVA; BOGUSZ, 2019). Porém seu uso como planta medicinal também vem sendo investigado há um bom tempo, mas pouco se fala sobre o mesmo.

O lúpulo é muito cultivado na Alemanha e Estados Unidos, visto que estes locais teriam condições adequadas para o cultivo, como solos argilosos ou arenosos profundos, de fácil drenagem, com alta exposição à luz e clima frio. Por essas considerações, acreditava-se que o lúpulo não poderia ser cultivado no Brasil, porém a produção do mesmo no sul, sudeste, norte e nordeste do país se desenvolveu. Em 2014 no estado de São Paulo, o lúpulo começou a ser mais cultivado, e mais recentemente nos outros estados, visando uma autossuficiência na produção desta matéria prima tão importante para a indústria cervejeira, visto que o Brasil produz cerca de 14 bilhões de litros de cerveja por ano (DURELLO; SILVA; BOGUSZ, 2019).

Das propriedades medicinais estudadas sobre o lúpulo, inclui-se o efeito sedativo, onde alguns suplementos alimentares já existem para o tratamento de distúrbios do sono. Estudos *in vitro* e *in vivo* também mostraram que certos compostos do lúpulo têm potencial para se tornarem novos agentes anticancerígenos (HRNČIČ *et al.*, 2019). O lúpulo também exibe bioatividade contra diabetes, osteoartrite, osteoporose e doença cardiovascular. Possui potenciais efeitos anti-inflamatórios, antimicrobianos, não devido somente a composição análoga de α - β -ácidos presentes na lupulina, mas também devido às prenilflavanonas, como o xanthohumol de significativo potencial antioxidante e o isoxanthohumol de efeito pró-estrogênico (SANTANA, 2020).

Compostos fenólicos são substâncias do metabolismo secundário de plantas que possuem um ou mais núcleos aromáticos contendo pelo menos um substituinte hidroxilado e/ou seus derivados funcionais, como ésteres, éteres e glicosídeos (ZUANAZZI; MONTANHA;

ZUCOLOTTI, 2017). Tem-se evidências de que doenças causadas por reações oxidativas podem ser retardadas pela ingestão de compostos fenólicos, já que estes possuem comprovada atividade antioxidante. Estudos relatam que as folhas de lúpulo possuem significativos teores de compostos fenólicos, agregando assim valor as mesmas, uma vez que elas são descartadas no processo cervejeiro (SANTOS, 2018). Sendo assim, o presente projeto tem como objetivo pesquisar o conteúdo de compostos fenólicos nas folhas de lúpulo.

2 OBJETIVOS

Quantificar compostos fenólicos nas folhas da planta *Humulus lupulus*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A seguir serão apresentadas considerações sobre o lúpulo do gênero *Humulus*, tais como sua história, características botânicas, atividades biológicas e componentes.

3.1 História do Lúpulo

A origem do lúpulo vem da Europa e nordeste da Ásia, como uma planta selvagem. O nome popular “lúpulo”, derivou do termo latim “*lupus*” (lobo), por ser uma planta que germina no solo e se mantém-se enraizada por toda sua vida, tendo facilidade de subir em outras plantas, e também pelo seu rápido crescimento. Foi usado pelos egípcios e sumérios, a cerca de 3 mil anos atrás, na produção de cerveja. Nos séculos XII e XIII, na Alemanha, também era amplamente utilizado no processo cervejeiro. Nos séculos VIII e IX, grandes jardins de lúpulo eram cultivados em conventos monastérios (SILVA, 2020).

Paracelsus cita o uso do lúpulo contra a indigestão, no século XVI. Matthioli, médico italiano mencionou os efeitos diuréticos e o botânico alemão Hieronymus Bock relatou a primeira aplicação do lúpulo na ginecologia. O lúpulo quando era colhido por mulheres ocasionava nas mesmas distúrbios menstruais, foi aí que então, na metade do século XX,

pesquisas demonstraram fortes propriedades estrogênicas presentes no lúpulo. No século XVIII, as inflorescências femininas eram colocadas em traveseiros para ajudar a adormecer, então a partir do século XIX, o lúpulo teve relatos de efeitos contra a insônia. O extrato da planta de lúpulo em combinação com o de valeriana (*Valeriana officinalis*) era administrado com frequência como sedativo (SPÓSITO *et al.*, 2019).

O primeiro relato conhecido da funcionalidade do lúpulo em bebidas foi escrito por Hildegard Von Bingen (abadessa e botânica alemã) em 1158. Ela confirmou, indiretamente, as propriedades antimicrobianas do lúpulo, recomendando a adição do mesmo às bebidas, com o objetivo de prolongar a sua vida útil. A botânica acreditava que o seu amargor impedia a putrefação das bebidas, deste modo, adicionando-a em bebidas prolongaria sua vida útil (SPÓSITO *et al.*, 2019).

3.2 Características botânicas

Existem três espécies de lúpulo, porém a única produtora de lupulina é *Humulus lupulus*, sendo assim o mais utilizado. A espécie possui ramos e hastes vigorosos, crescendo mais de 8 metros em 4 a 5 meses. As flores (cones) medem cerca de 5 a 6 cm e apresentam algumas pétalas. As raízes são de extrema importância para o armazenamento de carboidratos, sendo esses essenciais para o crescimento e desenvolvimento da planta no ano seguinte (DODDS, 2017). As folhas (Figura 1) são cordiformes, trilobadas ou pentalobadas, podendo chegar a mais de 20 cm de comprimento, possuindo superfície rugosa, pecíolos longos e coloração verde-escuro a amarelo-amarronzado (SILVA, 2020).

A planta inicia seu ciclo reprodutivo em 2 anos, tendo o pico em 3 anos. Para o processo cervejeiro, as plantas masculinas devem ser retiradas do cultivo, para que se evite a fertilização, pois este processo desencadeia a oxidação de ácidos graxos das sementes, deixando um sabor desagradável à bebida. Também sem a presença de sementes, o lúpulo fica mais rico em resinas e óleos essenciais (SANTOS, 2020). A resina amarelada, lupulina, é secretada pelas glândulas, encontradas na base das inflorescências (Figura 2) das plantas fêmeas, que sintetiza e armazenas (CLARK *et al.*, 2013).

Figura 1 - Folhas do lúpulo, variedade Columbus. Cervejaria Lúpulos da Serra, Nova Bassano/RS.



Fonte: O autor (2022).

Figura 2 - Cones/inflorescências do lúpulo, variedade Chinook. Cervejaria Lúpulos da Serra, Nova Bassano/RS.



Fonte: O autor (2022).

3.3 Compostos presentes no lúpulo

Análises das inflorescências do lúpulo encontraram principalmente resinas totais, óleos essenciais, proteínas, monossacarídeos, polifenóis, pectinas, aminoácidos, ceras e esteroides, cinzas, água, celulose/lignina. Fatores climáticos, variedades, fatores pré e pós-colheita podem influenciar na quantidade de cada componente. Dando enfoque aos fenóis, os quais foram trabalhados nesta pesquisa, os mais comumente encontrados são flavonoides, flavan-3-óis, taninos, ácidos fenólicos, flavonoides prenilados, multifídeos glicosilados e estilbenos. (DURELLO; SILVA; BOGUSZ, 2019).

As folhas também possuem teores significativos de compostos fenólicos. Silva (2020) conclui que:

Logo, pode-se concluir que as folhas de lúpulo produzidas no Brasil possuem teores relevantes de compostos fenólicos e flavonoides, podendo ser fonte de moléculas bioativas, potencial atividade antioxidante, seletividade quando se diz respeito à sua atividade antitumoral e desperta interesse em formas diferentes de veiculação de seus extratos e/ou substâncias isoladas de forma a potencializar suas ações biológicas.

Os flavonoides são a classe mais diversificada de compostos fenólicos da natureza, possuindo diferentes funções metabólicas nas plantas (absorção de radiação UV, polinização, defesa contra bactérias e fungos). Os flavan-3-óis e os taninos estão entre os últimos compostos sintetizados na via dos flavonoides. Os ácidos fenólicos do lúpulo podem ser encontrados em quantidades pequenas, eles são compostos orgânicos que apresentam pelo menos um grupo fenólico e uma carboxila na mesma molécula. Estilbenos como o trans-resveratrol, merecem destaque devido aos efeitos cardioprotetivos. Multifídeos glicosilados são conhecidos por serem substâncias polares e solúveis em água, e por apresentarem baixíssimo limiar de percepção de gosto amargo. Eles são extraídos na etapa de fervura, para o mosto, no processo cervejeiro (DURELLO; SILVA; BOGUSZ, 2019).

3.4 Principais efeitos biológicos do lúpulo

O lúpulo exerce alguns efeitos biológicos, que foram mais amplamente estudados nas inflorescências, mas também em suas folhas. Como exemplo temos o efeito antioxidante que

retarda ou impede a oxidação de um substrato, diminuindo o estresse oxidativo. As espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas no metabolismo normal. É preciso ter um bom equilíbrio entre os mecanismos oxidativos e antioxidantes. O estresse oxidativo é aumentado quando se possuem patologias, como por exemplo, células com baixo suprimento de oxigênio na isquemia crônica ou aguda, formação excessiva de NO (óxido nítrico) como nas doenças autoimunes ou alergias. Substâncias do lúpulo utilizadas contra o câncer, vem sendo estudadas devido ao seu potencial antioxidante, como o xantohumulol. Ele parece atuar de forma sinérgica com os tratamentos quimioterápicos usuais, permitindo assim a diminuição das doses administradas. Também interfere em várias proteínas que influenciam a proliferação, invasão, migração, apoptose ou resistência a muitos quimioterápicos em pacientes com câncer, porém seus mecanismos ainda não são conhecidos. Muitos agentes quimioterápicos atuam justamente estimulando a formação de radicais livres nas células neoplásicas. Estudos relataram que o xantohumulol, embora tenha um alto poder antioxidante, também induz uma importante produção de radicais livres em várias linhagens celulares neoplásicas, causando sua apoptose, tendo assim uma importância significativa na etiologia de neoplasias. Na síndrome metabólica, o lúpulo também apresenta influências, por exemplo, a obesidade também influencia o estresse oxidativo. Em experimentos animais, o xantohumulol reduziu o peso corporal, a absorção de lipídios e a glicose plasmática. Ele induz o estado catabólico. Em experimentos, a isohumulona é capaz de elevar o HDL-c no plasma e reduzir o índice aterogênico de maneira dose-dependente. Em relação a glicemia, um estudo realizado em camundongos que foram alimentados com uma dieta rica em gordura, o tetrahidroxantohumulol apresentou melhora significativa na depuração da glicose, reduzindo o tempo e o pico de hiperglicemia (ZUGRAVU *et al.*, 2022).

A atividade antimicrobiana do lúpulo geralmente é conhecida devido ao seu alto teor de ácidos amargos e polifenóis, o lúpulo inibe o crescimento de um amplo espectro de microrganismos, sendo por isso muito utilizado na indústria cervejeira. Estudos apontaram que lupulona, xantohumulol e desmetilxantohumulol exibiram atividade antimicrobiana contra MRSA (*Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina), bem como a capacidade de inibir a formação de biofilme, onde a lupulona exibiu o efeito mais forte, seguido pelo xantohumulol. Extratos etanólicos de lúpulo também apresentaram um efeito antimicobacteriano em cepas sensíveis e resistentes à rifampicina. Também foi destacada a atividade antifúngica do óleo essencial e do extrato dos cones femininos (devido à presença de desmetilxantohumulol e co-humulona), que apresentam redução no crescimento de *Zymoseptoria tritici*. A combinação do óleo essencial

de lúpulo com fungicidas sintéticos pode ser uma estratégia adequada para reduzir a dose de fungicidas convencionais na proteção de cultivos (ASTRAY *et al.*, 2020).

Quando o organismo apresenta uma inflamação, significa que é uma resposta biológica do mesmo a uma lesão ou infecção. Ácidos amargos e compostos polifenólicos do lúpulo (principalmente humulona, xantohumol e 8-prenilnaringenina) foram identificados como moléculas promissoras para inibir processos inflamatórios (ASTRAY *et al.*, 2020).

O lúpulo apresenta substâncias promissoras para atuarem a nível biológico, porém ainda são necessários ensaios clínicos para que essas evidências sejam confirmadas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

As folhas do lúpulo, variedade Columbus, foram colhidas na cidade de Nova Bassano, Rio Grande do Sul, Brasil, na Cervejaria Lúpulos da Serra, localizada na Rua Francisco Bodanese, 604 – Vila Bassanense (coordenadas geográficas 28°44'26.4"S 51°41'25.2"W), no dia 10 de abril de 2022 (Figura 3). A espécie colhida foi *Humulus lupulus* L.. O material foi colhido novamente no dia 28 de maio e as exsiccatas foram depositadas no Herbário RSPF do Instituto da Saúde da UPF, ligado ao Museu Zoobotânico Augusto Ruschi (MUZAR), sob números de tombo RSPF 14849 e 14850.

Figura 3 – Plantação de Lúpulo, Cervejaria Lúpulos da Serra/ Nova Bassano – RS.



Fonte: O autor (2022).

4.2 Preparação dos extratos e determinação do conteúdo de fenólicos

As técnicas de preparação dos extratos e determinação do conteúdo de fenólicos foram baseadas em Santos (2018) e Souza *et al.* (2007), com algumas modificações.

As folhas foram secas naturalmente, espalhadas sobre uma superfície, em temperatura ambiente, por cerca de sete dias. Foram observadas até estarem bem quebradiças para após serem moídas em um macro moinho tipo Willye. As folhas secas e moídas foram inicialmente lavadas com o solvente hexano, a fim de retirar os compostos mais apolares, principalmente clorofila, que poderiam atrapalhar a reação colorimétrica. Para isso juntou-se o material vegetal com hexano, em banho de ultrassom, sendo em seguida realizada uma filtração por funil de Büchner. As folhas foram então novamente recolhidas e acrescentado mais hexano. Este procedimento foi realizado por três vezes, sempre filtrando ao final, gerando um material vegetal desengordurado.

O material vegetal desengordurado foi extraído com etanol em banho de ultrassom. Após a extração, o material foi filtrado por algodão e este filtrado foi concentrado em evaporador rotatório, até a obtenção do extrato seco. Foi então pesado cerca de 0,1 g de extrato seco, e transferido para balão volumétrico de 50 mL, completando com etanol até a marca

obtendo-se uma solução de concentração de 2 mg/mL. Deste balão retiraram-se alíquotas de 1 mL, 4 mL, 6 mL, 8 mL para balões de 10 mL, que foram completados com etanol até a marca. Desta maneira foram obtidas soluções de concentração 0,2 mg/mL; 0,8 mg/mL; 1,2 mg/mL e 1,6 mg/mL.

Após o processo descrito, foram retiradas alíquotas de 1 mL, das diferentes concentrações descritas acima, para balões de 10 mL, acrescentando-se em torno de 4 mL de água e 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu. Agitou-se e deixou-se em repouso por 5 minutos. Após, foram acrescentados 2 mL de uma solução de carbonato de sódio a 14% (p/v), homogeneizando novamente e então foi completado o volume do balão com água. A solução ficou em repouso por 2 horas, protegida da luz. A leitura foi feita em espectrofotômetro UV/Vis, no comprimento de onda de 760 nm. O aparelho foi zerado com o branco (todos os reagentes menos a amostra) (SOUSA *et al.*, 2007).

O conteúdo de fenólicos totais foi expresso em miligramas (mg) equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama (g) de extrato seco. Ele foi obtido a partir de uma curva de calibração de ácido gálico, realizada nas mesmas condições de análise.

4.3 Curva padrão de ácido gálico

Primeiramente foi feita a diluição do padrão de ácido gálico, nas concentrações especificadas. Foi pesado exatamente cerca de 0,1 g de ácido gálico padrão. Após foi transferido para balão volumétrico de 100 mL e completado com metanol até a marca, homogeneizando.

Uma alíquota de 5 mL foi retirada e transferida para um balão volumétrico de 50 mL, completando-o até a marca com metanol. Deste último balão de 50 mL, foram retiradas alíquotas de 0,2; 0,4; 0,6 e 0,8 mL (em triplicata), para balões volumétricos de 10 mL.

Reação: Em um balão volumétrico de 10 mL, foi transferida a solução padrão de ácido gálico adicionando-se 0,5 mL do Reagente de Folin-Ciocalteu mais água. Foi agitado suavemente e após deixado em repouso por 5 minutos. Após, foi acrescentado 2 mL da solução aquosa de carbonato de sódio a 14% e completando com água destilada até a marca. Após ser deixado em repouso por 2 horas foi realizada a leitura em espectrofotômetro visível em comprimento de onda de 760 nm, frente ao branco.

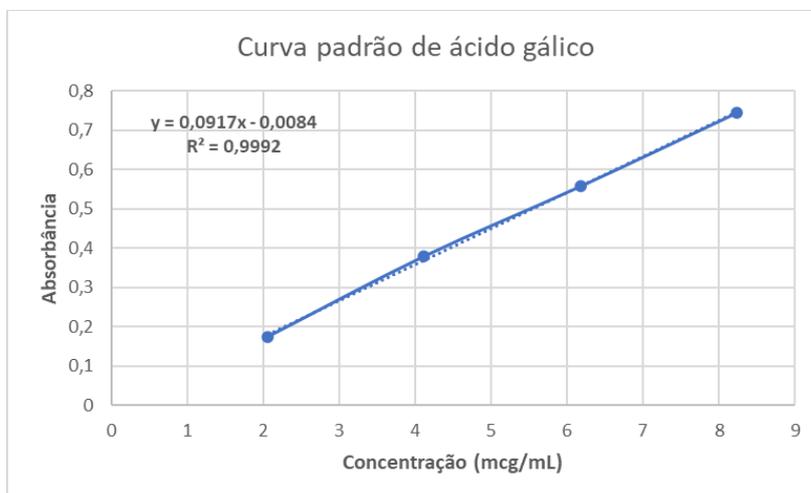
Branco: em balão volumétrico de 10 mL, colocou-se 1 mL de metanol + 0,5 mL do Reagente Folin-Ciocalteu. Foi agitado e deixado em repouso 5 minutos. Adicionou-se 2 mL da solução de carbonato de sódio 14%, completando a 10 mL com água. Por fim, foi necessário repouso por 2 horas e após a leitura.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A quantificação de fenólicos nas folhas de lúpulo foi realizada através de uma técnica espectrofotométrica, que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu. O reagente consiste de mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungstístico, no qual o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação 6^+ mas, na presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados molibdênio azul e tungstênio azul, nos quais a média do estado de oxidação dos metais está entre 5 e 6 e cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras, que não necessariamente precisam ter natureza fenólica (SOUSA *et al.*, 2007).

Para a determinação de compostos fenólicos no extrato das folhas de *Humulus lupulus*, foi construída uma curva de calibração utilizando o ácido gálico como substância química de referência (Figura 4), sendo que a equação da reta obtida foi a seguinte: $y = 0,0917x - 0,0084$ com $R^2 = 0,9992$.

Figura 4 - Curva de calibração do ácido gálico nas concentrações de 2 a 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$



Fonte: O autor (2022).

O conteúdo de compostos fenólicos totais foi obtido através da interpolação das absorvâncias das amostras na curva de calibração obtida pelo ácido gálico. Os resultados foram expressos em miligramas equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama de extrato seco. A quantidade encontrada de fenólicos totais não extrato etanólico das folhas de lúpulo foi de 29,25 mg EAG g⁻¹ de extrato seco.

A primeira análise foi realizada com três variedades da planta *H. lupulus* (variedades Mantiqueira, Chinook e Columbus). Nesta, os ensaios foram realizados em triplicata, para cada uma das variedades, utilizando-se a concentração de 0,2 mg/mL. No entanto, observou-se que nesta concentração a absorvância lida foi muito baixa, ficando fora da faixa de linearidade do método. Foram então testadas outras concentrações (de 0,8; 1,2; 1,6 e 2,0 mg/mL), agora somente com a variedade Columbus. Desta maneira os valores de absorvância observados ficaram dentro da faixa de linearidade, sendo estes resultados então utilizados para os cálculos do conteúdo de fenólicos totais nas folhas de lúpulo.

Silva (2020) quantificou compostos fenólicos em folhas de *H. lupulus* e encontrou no extrato etanólico bruto $75,5053 \pm 8,0443$ mg EAG/g amostra e na fração hidrometanólica, o teor foi de $91,8497 \pm 7,2925$ mg EAG/g amostra. Para seu estudo, foram coletadas cerca de 1,5 kg de folhas frescas submetidas ao processo de secagem em estufa de ar circulante a 40°C e à trituração até o estado de pó fino em moinho de facas. Esse material vegetal triturado foi submetido à extração por percolação exaustiva com etanol, o volume total de etanol utilizado foi 4.450 mL. A cada dois dias, o percolado foi recolhido e concentrado em rotaevaporador, temperatura não superior a 40°C. Esse processo foi repetido até o esgotamento, quase que total, da droga, obtendo o extrato etanólico bruto (EEB). A percolação teve duração de 12 dias. O método utilizado foi o de Folin-Ciocalteu obtendo uma curva de calibração, utilizando o padrão de ácido gálico.

Um estudo analisou o conteúdo de fenólicos totais no lúpulo, utilizando amostras hidrolisadas, e encontrou $2,9 \pm 0,1$ mg de ácido gálico/g de amostra seca. Neste caso, não foi utilizado o extrato seco, e sim amostra seca (folhas), que não possui a mesma concentração do extrato, justificando os valores baixos encontrados. O conteúdo fenólico total foi medido pelo ensaio Folin-Ciocalteu (PROESTOS *et al.*, 2006).

Em outro estudo, trabalhando com os cones de Salutar (*Humulus lupulus Linnaeus*), os pesquisadores encontraram teores de fenólicos totais de 52,58 a 91,9 mg EAG/g de extrato. Os resultados foram diferentes para cada variedade de planta e também dependeram dos solventes

utilizados na extração. Nesse caso, os valores foram mais altos do que aqueles encontrados em nosso estudo, pois o material vegetal utilizado foram os cones da planta e não as folhas (LYU *et al.*, 2022).

Nesta outra pesquisa, foi realizada extração com álcool metílico, etílico e isopropílico, em diferentes concentrações e utilizando a técnica de extração assistida por ultrassom. Os resultados variaram de 0,02 a 6,60 mg EAG/g de material seco. Neste caso os resultados foram bem menores por se tratar de material vegetal seco e não extrato seco (MUZYKIEWICZ *et al.*, 2019).

Entre os extratos hidroetanólicos analisados pelo estudo desenvolvido por Arruda *et al.* (2021), as cultivares Canastra e Columbus apresentaram os maiores teores de fenólicos totais (35,10 mg EAG/g e 31,09 mg EAG/g de matéria seca, respectivamente), enquanto as cultivares Spalt e Saaz apresentaram o menor teor (15,22 e 14,31 mg EAG/g de matéria seca, respectivamente). O material vegetal consistiu em cones de nove cultivares brasileiras analisadas. Os compostos fenólicos totais foram determinados por espectrofotometria usando o Reagente de Folin-Ciocalteu (ARRUDA *et al.*, 2021).

Em outro estudo, compostos bioativos do lúpulo brasileiro (*Humulus lupulus L.*) foram extraídos por ultrassom e seu perfil fenólico comparado com lúpulo comercial dos EUA. O lúpulo brasileiro apresentou maior teor de fenólicos totais ($33,93 \pm 0,67$ mg EAG g⁻¹). Os principais compostos fenólicos presentes nos extratos foram os flavonoides isoquercitrina e quercetina (ALMEIDA *et al.*, 2020).

As diferenças entre os resultados obtidos nos vários estudos, podem ser justificadas por terem sido utilizados diferentes métodos, solventes ou tempos de extração. Fatores como, local onde a planta cresceu, a variedade do lúpulo, a parte utilizada, a época de colheita, influência das condições climáticas, entre outros elementos ambientais também podem modificar os resultados atingidos.

Os polifenóis despertam amplo interesse para a indústria alimentícia e farmacêutica, pois eles apresentam inúmeras atividades biológicas benéficas contribuindo para a prevenção e controle de várias doenças. Foram descobertas atividades antioxidantes, anticarcinogênicas, antienvelhecimento e antimicrobiana, bem como, efeito cardioprotetor e propriedades anti-inflamatórias. Tais compostos podem funcionar na prevenção do aparecimento de doenças crônicas através da diminuição da formação de espécies reativas de O₂ e do seu dano causado.

Por outro lado, a ação antimicrobiana poderá servir para a procura de novos compostos antimicrobianos, cujos mecanismos de ação sejam diferentes dos já existentes (NEVES, 2015).

Os compostos fenólicos são produzidos nas células de uma planta, e podem proteger a planta contra pragas e outros fatores de estresse. Também, contribuem para a cor e o sabor e, em concentrações mais altas, protegem as plantas do ataque de bactérias, fungos, vírus e animais herbívoros. É importante ressaltar que o teor de compostos fenólicos em uma planta pode variar significativamente, e a concentração pode ser fortemente dependente de fatores genéticos e ambientais. Portanto, o teor de compostos fenólicos pode ser muito influenciado pelas condições presentes na área de cultivo. Diferentes métodos extrativos também podem interferir no teor de compostos extraídos (VIŠNJEVEC; SCHWARZKOPF, 2020).

Apesar disso, muitas vezes existem diferenças significativas entre a atividade *in vitro* e *in vivo*. Essas diferenças se justificam com a variação na biodisponibilidade destes compostos, consequência das diferenças na solubilidade no meio, na absorção e na metabolização. Portanto é necessário que estudos sejam feitos gradativamente para que resultados positivos sejam obtidos e que possam auxiliar na promoção à saúde (NEVES, 2015).

6 CONCLUSÃO

As folhas de *Humulus lupulus* variedade Columbus apresentaram 29,25 mg g⁻¹ de compostos fenólicos totais. Diante disso os resultados evidenciaram que as folhas, e não somente os cones, podem ser fonte de compostos de interesse farmacológico. Destacam-se as variações que podem ocorrer nos resultados finais em função de fatores ambientais e de diferenças na preparação dos extratos.

REFERÊNCIAS

- ALMAGUER, C. *et al.* *Humulus lupulus* - a story that begs to be told. A review. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 120, n. 4, p. 289–314, 2014.
- ALMEIDA, A. DA R. *et al.* Bioactive compounds and antioxidant activities of Brazilian hop (*Humulus lupulus* L.) extracts. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 1, p. 340–347, 2020.

ARRUDA, T. R. *et al.* A new perspective of a well-recognized raw material: Phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities and α - and β -acids profile of Brazilian hop (*Humulus lupulus* L.) extracts. **Lwt**, v. 141, n. July 2020, p. 110905, 2021.

ASTRAY, G. *et al.* *Humulus lupulus* L. as a natural source of functional biomolecules. **Applied Sciences (Switzerland)**, v. 10, n. 15, p. 1–19, 2020.

CLARK, S. M. *et al.* Transcriptome analysis of bitter acid biosynthesis and precursor pathways in hop (*Humulus lupulus*). **BMC Plant Biology**, p. 1–14, 2013.

DODDS, K. **Hops - a guide for new growers**. NSW Government - Department of Primary industries. Austrália, 2017.

DURELLO, R. S.; SILVA, L. M.; BOGUSZ, S. Hop Chemistry. **Quimica Nova**, v. 42, n. 8, p. 900–919, 2019.

HRNČIČ, M. K. *et al.* Hop compounds: Extraction techniques, chemical analyses, antioxidative, antimicrobial, and anticarcinogenic effects. **Nutrients**, v. 11, n. 2, 1 fev. 2019.

LYU, J. IL *et al.* Comparative Study on Phenolic Compounds and Antioxidant Activities of Hop (*Humulus lupulus* L.) Strobile Extracts. **Plants**, v. 11, n. 1, p. 1–10, 2022.

MUZYKIEWICZ, A. *et al.* Comparison of antioxidant activity of extracts of hop leaves harvested in different years. **Herba Polonica**, v. 65, n. 3, p. 1–9, 2019.

NEVES, P. Importância dos compostos fenólicos dos frutos na promoção da saúde. p. 80, 2015.

PROESTOS, C. *et al.* Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. **Food Chemistry**, v. 95, n. 4, p. 664–671, 2006.

SANTANA, V. N. **Avaliação da composição química da atividade biológica de *Humulus lupulus* var. Columbus**. Dissertação (Programa de Pós- Graduação em Química). Jequié, Bahia: UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB, 2020.

SANTOS, F. C. DOS. **Variabilidade fenotípica de alfa-ácido de lúpulo (*Humulus Lupulus* L.) cultivados nas regiões do Brasil**. Dissertação (Curso de Pós- Graduação em Produção Vegetal). [s.l.] Universidade do Estado de Santa Catarina, 2020.

SANTOS, V. A. DOS. **Estudo fitoquímico e atividade antioxidante do extrato e frações das folhas de *Humulus lupulus* L. (*Cannabaceae*)**. Trabalho de Conclusão de Curso (graduando em farmácia). [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO, 2018.

SILVA, R. **Estudo botânico, fitoquímico e avaliação in silico e in vitro de atividades biológicas de folhas de *Humulus lupulus* L. (*Cannabaceae*) cultivadas no Brasil**. [s.l.]. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP, 2020.

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

SPÓSITO, M. B. *et al.* A cultura do Lúpulo. **Série Produtor Rural**, p. 81, 2019.

VIŠNJEVEC, A. M.; SCHWARZKOPF, M. Phenolic compounds in poorly represented mediterranean plants in Istria: Health impacts and food authentication. **Molecules**, v. 25, n. 16, 2020.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A.; ZUCOLOTTO, S. M. Flavonoides. In: SIMÕES, C. M. O. et al. Farmacognosia: do produto Natural ao Medicamento. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. p. 209-233. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788582713655/cfi/6/50!/4/2/2@0:0>. Acesso em: 20 jun 2022.

ZUGRAVU, C. A. *et al.* Antioxidants in Hops: Bioavailability, Health Effects and Perspectives for New Products. **Antioxidants**, v. 11, n. 2, p. 1–16, 2022.