UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO

ESCOLA DE FARMÁCIA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

VANESSA APARECIDA DOS SANTOS

ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO E FRAÇÕES DAS FOLHAS DE *Humulus lupulus* L. (Cannabaceae)

OURO PRETO

2018

VANESSA APARECIDA DOS SANTOS

ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO E FRAÇÕES DAS FOLHAS DE *Humulus lupulus* L. (Cannabaceae)

Trabalho de conclusão de curso graduando em farmácia da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, realizado sob orientação da Prof. MSc. Regislainy Gomes da Silva e co-orientação do Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza.

OURO PRETO

2018

S231e Santos, Vanessa Aparecida dos .
Estudo fitoquímico e atividade antioxidante do extrato e frações das folhas de Humulus lupulus L. (Cannabaceae) [manuscrito] / Vanessa Aparecida dos Santos. - 2018.

46f.: il.: color; grafs; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza.
Coorientador: MSc. Regislainy Gomes da Silva.

Monografia (Graduação). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Departamento de Farmácia.

1. Estudo fitoquímico. 2. Atividade Antioxidante . 3. Humulus lupulus L.. 4. Flavonoides. 5. Fenólicos. I. Souza, Gustavo Henrique Bianco de. II. Silva, Regislainy Gomes da . III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Titulo.

CDU: 615.2

Catalogação: ficha@sisbin.ufop.br

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP
Escola de Farmácia

TERMO DE APROVAÇÃO

Estudo Fitoquímico e Atividade Antioxidante de Extratos e frações das folhas de *Humulus lupulus* L. (Cannabaceae)

Trabalho de conclusão de Curso defendido por **Vanessa Aparecida dos Santos**, matrícula 12.1.2270 em 06 de julho de 2018, e aprovado pela comissão examinadora:

Profa. MSc. Regislainy Gomes da Silva
Orientadora, DEFAR-EF-UFOP

Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza
Coorientador, DEFAR-EF-UFOP

Prof. Dr. Orlando David Henrique dos Santos
DEFAR-EF-UFOP

Profa. MSc. Juliana Cristina dos Santos Almeida Bastos
FASAR

Rua Costa Sena, 171 - Centro – CEP: 35400-000 – OURO PRETO – MG- BRASIL
Home page: http://www.ef.ufop.br - E-mail: diretoria@ef.ufop.br - telefax: 0xx (31) 3559-1628

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus por permitir que tudo isso acontecesse e Nhá Chica pela proteção.

Aos meus pais, por todo apoio, amor e companheirismo, sempre estando ao meu lado.

A minha irmã, por me incentivar, acreditar e por sempre ter as melhores palavras de consolo.

Ao Lucas, por todo amor, paciência e companhia de cada dia.

Ao Ataíde, por me proporcionar momentos de felicidade e sempre estar presente.

As moradoras da República Utopia, pela amizade, força e por compreenderem minha ausência.

A minha orientadora MSc. Regislainy Gomes da Silva pela paciência em me explicar, ensinar e repetir o quanto fosse necessário até meu completo entendimento.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza pelos ensinamentos, confiança e apoio.

Ao Prof. Dr. Geraldo Célio Brandão pela análise das amostras e ajuda na identificação dos flavonoides.

A Cláudia Simões e colaboradores pela elaboração do livro Farmacognosia da Planta ao Medicamento, sendo um grande auxílio para o meu entendimento sobre o assunto tratado no presente estudo.

Ao Laboratório de Fitotecnologia pelo acolhimento.

Aos professores da graduação por todo ensinamento.

Aos amigos da Escola de Farmácia.

E a todos que fizeram parte dessa jornada de alguma maneira, muito obrigada.

RESUMO

As plantas medicinais têm contribuído fortemente para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Os produtos do metabolismo secundário possuem uma variedade de funções nas plantas, entre elas, proteção contra raios UV e ataque de herbívoros. Assim, pode-se também considerar o seu potencial efeito medicinal para os seres humanos. Flavonoides e os compostos fenólicos são classes importantes entre esses produtos de origem natural, podendo apresentar ação antitumoral, anti-inflamatória, antioxidante e antiviral, revelando sua importância farmacológica. A planta *Humulus lupulus* L., Cannabaceae, popularmente conhecido como lúpulo, tem uma longa história na terapêutica para tratar uma ampla gama de enfermidades e desconfortos como insônia, nervosismo, excitabilidade e agitação associadas à tensão de dor de cabeça, para melhorar o apetite e a digestão, aliviar dor de dente, dor de ouvido e neuralgia. Assim, neste estudo foram avaliados teores de fenólicos e flavonoides totais, bem como a identificação desses compostos, além da análise da atividade antioxidante do extrato etanólico bruto e frações hexânica e hidrometanólica das folhas dessa espécie. Assim, obteve-se como resultado da prospecção fitoquímica a identificação de flavonoides Caempferol-3-*O*-rutinosídeo, Quercetina-3-*O*-rutinosídeo (Rutina), Caempferol-3-*O*-robinosídeo-7-raminosídeo no extrato bruto das folhas do lúpulo. Na quantificação de compostos fenólicos obteve-se os seguintes valores: 75,4053, -31,346 e 91,8497 mg EAG/g de amostra, para o extrato etanólico bruto e frações hexânica e hidrometanólica respectivamente; na quantificação de flavonoides os valores foram 0,96596, 6,6043 e 4,6712 mg ER/g de amostra para a mesma ordem das amostras acima. Na avaliação do potencial antioxidante, obteve-se a IC_{50} de 105,60µg/mL para o extrato etanólico bruto, 675,71µg/mL para a fração hexânica e 126,72µg/mL para a fração hidrometanólica. Os resultados obtidos demonshtram grande potencial terapêutico da planta adaptada no Brasil devido a presença de grande variedade de compostos fenólicos e flavonoides, o que pode agregar valor às folhas do *Humulus lupulus,* uma vez que grande parte dela é descartada após a colheita dos cones do lúpulo.

Palavras-Chave: estudo fitoquímico, atividade antioxidante, *Humulus lupulus*, flavonoides, fenólicos.

ABSTRACT

Medicinal plants have contributed strongly to the development of new therapeutic strategies. Secondary metabolism products have a variety of functions in plants, including UV protection and herbivorous attack. Thus, one can also consider its potential medicinal effect for humans. Flavonoids and phenolic compounds are important classes among these products of natural origin, being able to present antitumor, anti-inflammatory, antioxidant and antiviral action, revealing their pharmacological importance. The plant *Humulus lupulus* L., Cannabaceae, popularly known as hops, has a long history in therapeutics to treat a wide range of diseases and discomforts such as insomnia, nervousness, excitability and agitation associated with headache tension, to improve appetite and digestion, relieving toothache, ear pain and neuralgia. Thus, in this study, total phenolic and flavonoid contents were evaluated, as well as the identification of these compounds, besides the analysis of the antioxidant activity of the crude ethanolic extract and hexane and hydrometanic fractions of the leaves of this species. Thus, as a result of phytochemical prospecting, the identification of flavonoids Kaempferol-3-*O*-rutinoside, Quercetin-3-*O*-rutinoside (Rutin), Kaempferol-3-*O*-robinoside-7-raminoside in the crude extract of leaves of hop. In the quantification of phenolic compounds, the following values were obtained: 75,4053, -31,346 and 91,8497 mg EAG/g of the sample, for the crude ethanolic extract and hexane and hydromethanolic fractions, respectively; in quantification of flavonoids the values were 0.96596, 6.6043 and 4.6712 mg ER / g of sample for the same order as the above samples. In the evaluation of the antioxidant potential, the IC_{50} of 105.60 µg/mL was obtained for the crude ethanolic extract, 675.71 µg/mL for the hexane fraction and 126.72 µg/mL for the hydrometanic fraction. The results obtained demonstrate a great therapeutic potential of the adapted plant in Brazil due to the presence of a great variety of phenolic compounds and flavonoids, which can add value to the leaves of *Humulus lupulus*, since much of it is discarded after the collection of the hops cones.

Key-words: phytochemical study, antioxidant activity, *Humulus lupulus*, flavonoids, phenolics.

LISTA DE ABREVIATURAS

CCD	Cromatografia em camada delgada
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CH_3COOK	Acetato de potássio
DEBIO	Departamento de Biodiversidade, Evolução e Meio Ambiente
ICEB	Instituto de Ciências Exatas e Biológicas
EAG	Equivalênte de ácido gálico
EC	Eletroforese capilar
EEB	Extrato etanólico bruto
ER	Equivalênte de rutina
ESI	Electron spray ionization (Ionização por *elétron-spray*)
ESI MS/MS	*Electron spray* ionization em massa/massa
eV	Elétron-volt
g	Gramas
g/mol	Gramas/mol
HPLC	*High Pressure Liquid Chromatography*
HPLC-MS	*High Pressure Liquid Chromatography* acoplada a espectrometria de massas
Kg	Quilograma
KV	Quilovolt
L.	Lineu
LTDA	Limitada
mA	Mili-Ampère
MG	Minas Gerais
Min	Minutos
mL	Mililitro
m/z	Razão massa/carga
nm	Nanometro
Na_2CO_3	Carbonato de sódio
NP/PEG	Difenilboriloxietilamina 1,0% em metanol e polietilenoglicol 4000 5,0% em etanol
P.A.	Pró análise
Pct.	Pacote

Psi	*Pound force per square inch*
R_f	Fator de retenção
R^2	Coeficiente de regressão
UFOP	Universidade Federal de Ouro Preto
Und.	Unidade
UPLC/MSMS	*Ultra performance liquid chromatography - tandem mass spectrometer*
UV	Ultravioleta
V	Volts
°C	Graus Celsius

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Ramos foliares com inflorescência de *Humulus lupulus* L..... 04

Figura 2: (A) Área de cultivo de lúpulo na cidade de Baependi-MG, (B) indivíduo *Humulus lupulus* L., (C) flores do lúpulo..... 06

Figura 3: Estrutura básica dos flavonoides adaptada de SIMÕES (2010)..... 09

Figura 4: Biossíntese de flavonoides. Adaptada de DEWICK (2009)..... 11

Figura 5: Fluxograma da metodologia de obtenção e análise fitoquímica do extrato etanólico bruto e frações de folhas de *Humulus lupulus*..... 18

Figura 6: Microplacas para quatificação do teor de fenólicos totais das folhas de *Humulus lupulus*..... 20

Figura 7: Microplacas para quatificação do teor de flavonoides totais das folhas de *Humulus lupulus*..... 21

Figura 8: A e B: Microplacas da determinação da atividade antioxidante das folhas de *Humulus lupulus*..... 23

Figura 9: Análise por CCD do extrato etanólico bruto e frações. Eluente: hexano:acetato de etila (6:4) e revelador: NP/PEG..... 24

Figura 10: Espectro *full scan* do extrato etanólico bruto de folhas de *Humulus lupulus*..... 25

Figura 11: Espectro de UV da substância 1 de TR: 2,832 min do extrato etanólico bruto de folhas de *Humulus lupulus* L..... 26

Figura 12: Espectro de massas TR: 2,832 min do extrato etanólico bruto de folhas de *Humulus lupulus* L..... 27

Figura 13: Proposta de fragmentação da substância 1, com TR: 2,832 min do extrato etanólico bruto de folhas de *Humulus lupulus* L..... 28

Figura 14: Espectro de UV da substância 2, com TR: 2,618min do extrato etanólico bruto das folhas de *Humulus lupulus*..... 29

Figura 15: Espectro de massas TR: 2.618 min do extrato etanólico bruto de folhas de *Humulus lupulus* L..... 30

Figura 16: Proposta de fragmentação substância 2, com TR: 2,618min da fração do extrato bruto da folhas do *Humulus lupulus* L..... 31

Figura 17: Espectro de UV da substância 3, com TR: 2,628min do extrato etanólico bruto das folhas de *Humulus lupulus* L..... 32

Figura 18: Espectro de massas TR: 2,628 min do extrato etanólico bruto de folhas de *Humulus lupulus L.* 33

Figura 19: Proposta de fragmentação substância 3, com TR: 2.628min da fração do extrato bruto da folhas do *Humulus lupulus* L..... 34

Figura 20: Gráfico da curva analítica de ácido gálico para determinação do teor de fenólicos no extrato etanólico bruto e frações hexânica e hidrometanólica das folhas de *Humulus lupulus* L..... 35

Figura 21: Gráfico da curva analítica de rutina para determinação do teor de flavonoides no extrato etanólico bruto e frações hexânica e hidrometanólica das folhas de *Humulus lupulus* L..... 36

Figura 22: Gráfico da curva analítica de DPPH para quantificação do IC_{50} do extrato bruto e frações hexânica e hidrometanólica das folhas de *Humulus lupulus* L..... 37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais classes de flavonoides e algumas propriedades..... 10

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO..... 01
2. OBJETIVOS..... 02
2.1. Objetivos Gerais..... 02
2.2. Objetivos Específicos..... 02
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... 03
3.1. Utilização de plantas medicinais..... 03
3.2. Família Cannabaceae..... 03
3.3. *Humulus lupulus* L..... 04
3.4. Metabólitos secundários..... 07
3.4.1 Compostos fenólicos..... 08
3.4.2 Flavonoides..... 08
3.5 Atividade Antioxidante..... 14
4. METODOLOGIA..... 16
4.1. Coleta do material vegetal e obtenção do extrato..... 16
4.2. Determinação do perfil cromatográfico..... 16
4.3. Determinação do teor de fenólicos totais..... 18
4.4. Determinação do teor de flavonoides..... 20
4.5. Determinação da atividade antioxidante..... 22
5. RESULTADOS..... 24
6. DISCUSSÕES..... 38
7. CONCLUSÃO..... 41
8. REFERÊNCIAS..... 42

1. INTRODUÇÃO

O uso das espécies vegetais, na terapêutica popular e oficial, é observado desde o início da civilização, onde o homem despertou para um longo percurso de manuseio dos recursos naturais em seu próprio benefício (DI STASI, 1996). Nesse sentido, destaca-se a importância e relevância em se estudar as diversas partes da planta, em busca de novos usos terapêuticos para as mesmas.

O *Humulus lupulus* L. tem uma longa história de utilização medicinal para tratar uma ampla gama de enfermidades e desconfortos. Sendo principalmente recomendado como um sedativo suave e útil para tratar a insônia e nervosismo (BLUMENTHAL, 1998). Há relatos de seu uso no tratamento de excitabilidade e agitação associada à tensão de dor de cabeça; para melhorar o apetite e a digestão; aliviar dor de dente, dor de ouvido e neuralgia (GRIEVE, 1971; BARNES et al., 2002). Além disso, o lúpulo tem como objetivo exercer efeitos diuréticos, antiespasmódicos e anafrodisíacos (DUKE, 1985; WEISS, 1988; BLUMENTHAL, 1998).

Porém atualmente, a utilização e estudo do lúpulo estão voltados para produção de cervejas, no qual são utilizadas as inflorescências femininas, parte da planta que confere aroma e sabor característicos e contribui para a conservação do produto.

Sendo assim, as folhas do *Humulus lupulus* L. são um subproduto agrícola que atualmente não está sendo explorado em todo seu potencial (CEH et al., 2007). Tanto a literatura, quanto as caracteristicas fitoquimicas da planta indicam a presença de compostos fenólicos, flavonoides e muitas propriedades farmacológicas ainda não descritas ou exploradas proporcionando ao organismo humano a prevenção de diversas doenças.

A partir do extrato etanólico bruto e suas frações hexânica e hidrometanólica serão feitos os estudos fitoquímicos e da atividade antioxidante das folhas de *Humulus lupulus* L.

2. OBJETIVOS

2.1 – Objetivo Geral:

- Avaliar atividade antioxidante da folha do *Humulus lupulus* L. correlacionando com a presença de classes de metabólitos secundários encontrada.

2.2 – Objetivos específicos:

- Obter o extrato etanólico bruto da folha de *Humulus lupulus* L.;
- Realizar *screening* especifico para flavonoides;
- Obter frações do extrato etanólico bruto;
- Determinar o teor de fenólicos totais e flavonoides no EEB e frações;
- Identificar representantes da classe de metabólitos secundários investigadas anteriormente.
- Avaliar a capacidade antioxidante do EEB e frações da folha de *Humulus lupulus* L.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Utilização de plantas medicinais

As plantas medicinais são utilizadas pela população desde tempos imemoriais. A busca por alívio e cura de doenças, por meio da ingestão de ervas e folhas, talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização desses produtos. Instintivamente, o homem primitivo buscava descobrir soluções para suas necessidades básicas de sobrevivência, como alimentação, moradia, proteção e reprodução. Suas experiências e observações resultaram em descobertas importantes para soluções de tratamentos de injúrias ou doenças através do uso das plantas e ervas (VIEGAS JR. et al., 2006).

O uso de plantas medicinais, se encontra em expansão em todo o mundo e constitui um mercado bastante promissor, movimentando cerca de US$ 22 bilhões por ano (NASCIMENTO et al., 2004). Segundo a Organização Mundial de Saúde estima que 80% da população faz uso de plantas como medicamentos, englobando a utilização de cerca de 25.000 espécies (GARCIA, 1995).

3.2. Família Cannabaceae

A família Cannabaceae compreende vários gêneros, dentre os quais se destacam dois economicamente importantes, *Cannabis* e *Humulus* (HEYWOOD, 1985).

Caracterizada por árvores ou arbustos lenhosos, eretos ou escandentes, monoicos ou polígamos, sem látex. Estípulas interpeciolares, livres. Folhas simples, alternas, geralmente dísticas, base geralmente assimétrica, bordo dentado a serrado, nervura secundária basal alongada até o terço superior. Inflorescência axilar, cimosa, fasciculada, flores estaminadas agrupadas, flores pistiladas frequentemente geminadas ou solitárias, no ápice do ráque. Flores actinomorfas, monoclamídeas, 4-5 tépalas, livres ou unidas na base, isostêmone, com ou sem pistilódios ou estaminódios. Androceu com estames opostos a tépala, retos no botão; anteras reniformes, ditecas, dorsifixas com deiscência longitudinal. Gineceu com 2 estiletes, terminais; ovários súperos,

uniloculares, uniovulares; óvulo apical, anátropo. Frutos drupas, com estilete persistente (PEDERNEIRAS et al., 2011).

Sua importância econômica está relacionada *à* produção de fibras (hemp), óleos e sementes, bem como para a produção medicinal e recreativa de maconha e haxixe pelo gênero *Cannabis*. O *Humulus* (lúpulo) é utilizado como aromatizante de cerveja (fornecendo óleos essenciais amargos). O gênero *Celtis* está relacionado à produção de madeira e planejamento ornamental de ambientes, além de frutos que são ocasionalmente consumidos. Sendo Cannabis o gênero typus (JUDD et al. 2009).

3.3. *Humulus lupulus* L.

A planta *Humulus lupulus* L. (Fig. 1) pertence à família Cannabaceae e é popularmente conhecida como lúpulo, sendo uma planta florida, dióica, perene e escalada, nativa da Europa, Ásia Ocidental e América do Norte (HAUNOLD,1971; BETSON et al., 2005). As folhas são de cor verde escura, pecioladas e denteadas, possuindo forma de coração com 3-5 lóbulos e superfície muito rugosa (HAUNOLD,1991; HAUNOLD et al., 1993).

Figura 1: Ramos foliares com inflorescência de *Humulus lupulus* L. (Cannabaceae) Fonte: http://www.maisonterre.net/hops-organic/

O lúpulo tem uma difícil adaptação ao clima brasileiro, pois carece de temperaturas reduzidas e de um tempo de exposição à luz variado (EBY, 2011), variando entre nove e quatorze horas diárias, o que também não ocorre no território brasileiro. Porém, há comprovações de êxitos no Brasil, onde os agricultores recorreram à técnicas para aumentar o fotoperíodo, além de produtos para estimular a brotação uniforme durante a estação (MEGA et al., 2011; JEZEK et al., 2013). As sementes de lúpulo precisam de temperaturas baixas para induzir a germinação e sua produção. Normalmente e em forma natural, as sementes germinam na primavera quando o solo se aquece após os meses de intensos frios. O lúpulo gosta de solos bem drenados, ricos em húmus, com um pH que pode variar entre 6,0 e 6,5. O lúpulo é uma planta trepadeira e chega a uma altura de aproximadamente 4 metros, necessitando de uma área aproximadamente de 8 m². O maior interesse está nas flores femininas, onde encontra-se as glândulas de lupulina que produzem resinas e óleos essenciais proporcionando amargor, sabor e aroma às cervejas (JEZEK et al., 2013; EBY, 2011).

É bem conhecida ao longo do mundo como matéria-prima na indústria de fabricação de cerveja. As inflorescências femininas (cones do lúpulo ou "lúpulo"), são amplamente utilizadas para preservar a cerveja e dar-lhe um aroma e um sabor característicos. Além disso, os cones do lúpulo têm sido utilizados há muito tempo para fins medicinais. Os preparativos do lúpulo foram principalmente recomendados para o tratamento de distúrbios do sono, como sedativo suave, anti-inflamatório, para a ativação da função gástrica e dor estomacal (ZANOLI e ZAVATTI, 2008).

Houve um crescente interesse pelos benefícios para a saúde das plantas usadas na medicina tradicional. O *Humulus lupulus* recebeu particular atenção dos pesquisadores e, como resultado, foram publicados vários artigos. Partindo da segunda metade do século XX, vários estudos fitoquímicos foram realizados para investigar a composição dos cones de lúpulo e outras partes da planta, levando ao isolamento e identificação de compostos farmacologicamente relevantes, tais como flavononas, chalconas, derivados de cloroglucinol. Durante a última década, muitas investigações farmacológicas *in vitro* e *in vivo* tentaram produzir evidências científicas dos usos tradicionais relatados. O efeito do lúpulo

no sistema nervoso central e, em particular, sua eficácia nos distúrbios do sono, têm sido estudados, mas os resultados às vezes são contraditórios e novos experimentos são necessários (ZANOLI e ZAVATTI, 2008).

Outros componentes do lúpulo (por exemplo, folhas, hastes) têm recebido maior atenção como potenciais antioxidantes e agentes antibacterianos e antivirais, e até mesmo para a prevenção do câncer (GERHAUSER, 2005).

Alguns estudos preliminares mostraram que as concentrações de compostos fenólicos em extratos de folhas de lúpulo respondem bem ao seu potencial antioxidante, dando grande importância a esses tipos de análise (CEH et al., 2007). Como somente os cones do lúpulo são usados na indústria de fabricação de cerveja, grandes quantidades de folhas de lúpulo permanecem como um subproduto agrícola, que não é explorado, podendo ser uma potencial fonte de compostos fenólicos.

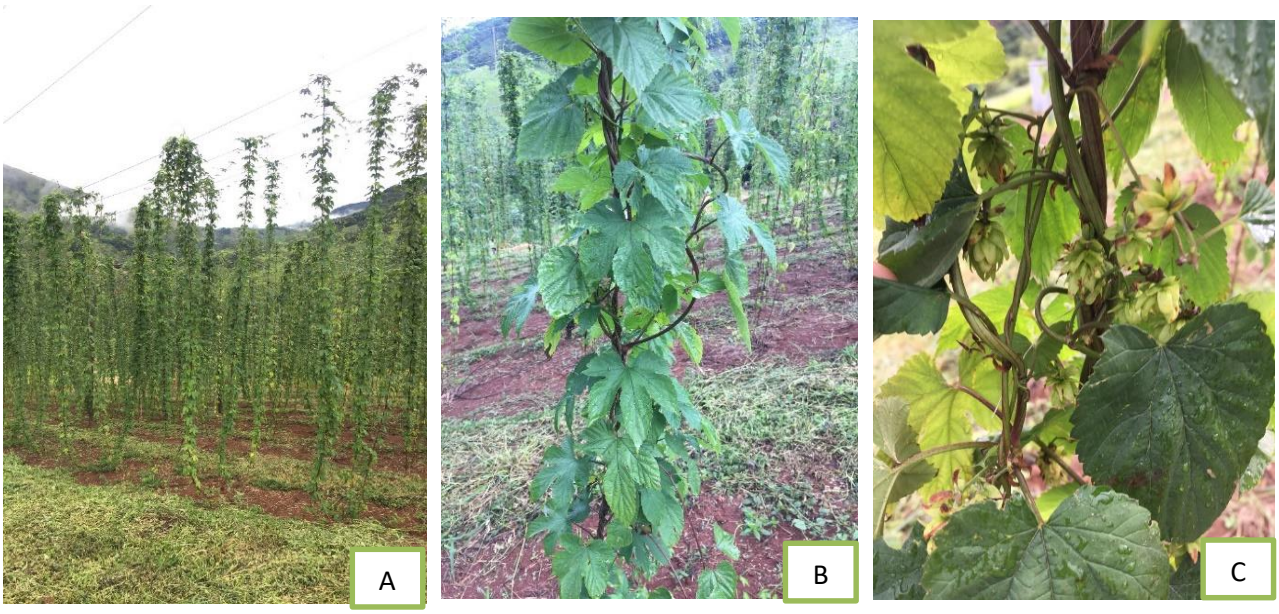


Figura 2 - (A) Área de cultivo de lúpulo na cidade de Baependi-MG, (B) indivíduo *Humulus lupulus* L., (C) flores do lúpulo.

3.4. Metabólitos secundários

Existem dois tipos de metabolismo nas plantas, o primário e o secundário. O metabolismo primário é o responsável pelas funções vitais da planta, já o metabolismo secundário produz substâncias que conferem características de proteção e adaptação ao ecossistema onde elas estão inseridas (SIMÕES et al., 2007).

Os metabólitos secundários, presentes nas plantas medicinais, têm colaborado fortemente para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (CALIXTO, 2005). Esses metabólitos podem ser divididos em três grupos distintos quimicamente: terpenos, compostos fenólicos e componentes contendo nitrogênio (SHAHIDI, 1997; CROTEAU et al., 2000; SHAHIDI; NACZK, 2003; SHAHIDI e HO, 2005; TAIZ e ZEIGER, 2006).

Esses metabólitos, normalmente dotados de estrutura complexa, baixo peso molecular, possuem atividades biológicas marcantes e, ao contrário dos metabólitos primários, apresentam-se em baixas concentrações e em determinados grupos de plantas (BERG e LUBERT, 2008). Embora os produtos secundários possuam uma variedade de funções nas plantas, é provável que a sua importância ecológica tenha alguma relação com potencial efeito medicinal para os seres humanos. Por exemplo, produtos secundários envolvidos na defesa das plantas através de citotoxicidade para patógenos microbianos podem ser úteis como medicamentos antimicrobianos em humanos, se não forem demasiado tóxicos. Da mesma forma, produtos do metabolismo secundário estão envolvidos na defesa contra herbívoros através de atividade neurotóxica; portanto, pode-se considerar seus potenciais efeitos benéficos em seres humanos através de sua ação no sistema nervoso central, atuando como antidepressivos, sedativos, relaxantes musculares ou anestésicos (KAUFMAN et al., 1999).

3.4.1. Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos pertencem a uma classe de compostos que inclui uma grande diversidade de estruturas, simples e complexas, que possuem pelo

menos um anel aromático no qual, ao menos, um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila (SIMÕES et al., 2000).

Existem cerca de cinco mil fenóis, dentre eles, destacam-se os flavonoides, ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis (SHAHIDI e NACZK, 1995).

Eles contribuem para o sabor, odor e coloração de diversos vegetais, sendo muitos desses importantes pela utilização como flavorizantes e corantes de alimentos e bebidas (SIMÕES et al., 2000).

Para alguns derivados de ácidos fenólicos tem sido relatada atividade antioxidante. Essas evidências têm sugerido que doenças causadas pelas reações oxidativas em sistema biológico podem ser retardadas pela ingestão de antioxidantes naturais encontrados na dieta, principalmente de compostos fenólicos (SIMÕES et al., 2000), reduzindo o risco de desenvolvimento de patologias, como arteriosclerose e câncer (RAMARATHNAM et al., 1995).

A atividade anticarcinogênica dos fenólicos tem sido relacionada à inibição dos cânceres de cólon, esôfago, pulmão, fígado, mama e pele. Os compostos fenólicos que possuem este potencial são resveratrol, quercetina, ácido caféico e flavonóis (PIMENTEL, FRANCKI, GOLLÜCKE, 2005).

3.4.2. Flavonoides

O grupo dos flavonóides é constituido por mais de 4000 compostos naturalmente metabolizados pelo reino vegetal. São compostos de baixo peso molecular e composição polifenólica de estrutura básica C6-C3-C6, formada por dois anéis fenil (A e B) ligados entre si por um anel pirano (C), (Figura 3) (PENG, et al, 2005).

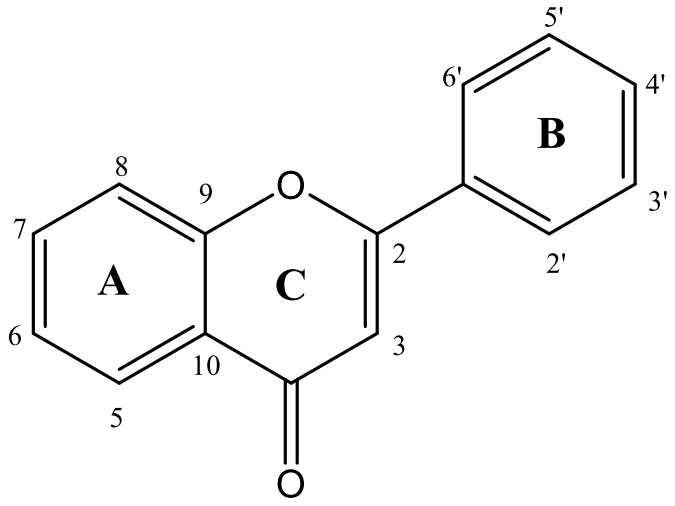


Figura 3: Estrutura básica dos flavonoides adaptada de SIMÕES (2010)

Os flavonoides encontrados nas folhas podem ser diferentes daqueles presentes nas flores, nos caules ou ramos, raízes ou frutos. O mesmo composto ainda pode ocorrer em diferentes concentrações, dependendo do órgão vegetal que se encontra (SIMÕES et al., 2000).

Entre os produtos de origem natural, os flavonoides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados. Os quais apresentam diversas funções, como proteção dos vegetais contra a incidência de raios ultravioleta e visível, proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias, atração de animais com finalidade de polinização, antioxidante, controle da ação de hormônios vegetais, ação alelopática e inibição de enzimas (HARBORNE,1989; HARBORNE e WILLIAMS, 2000).

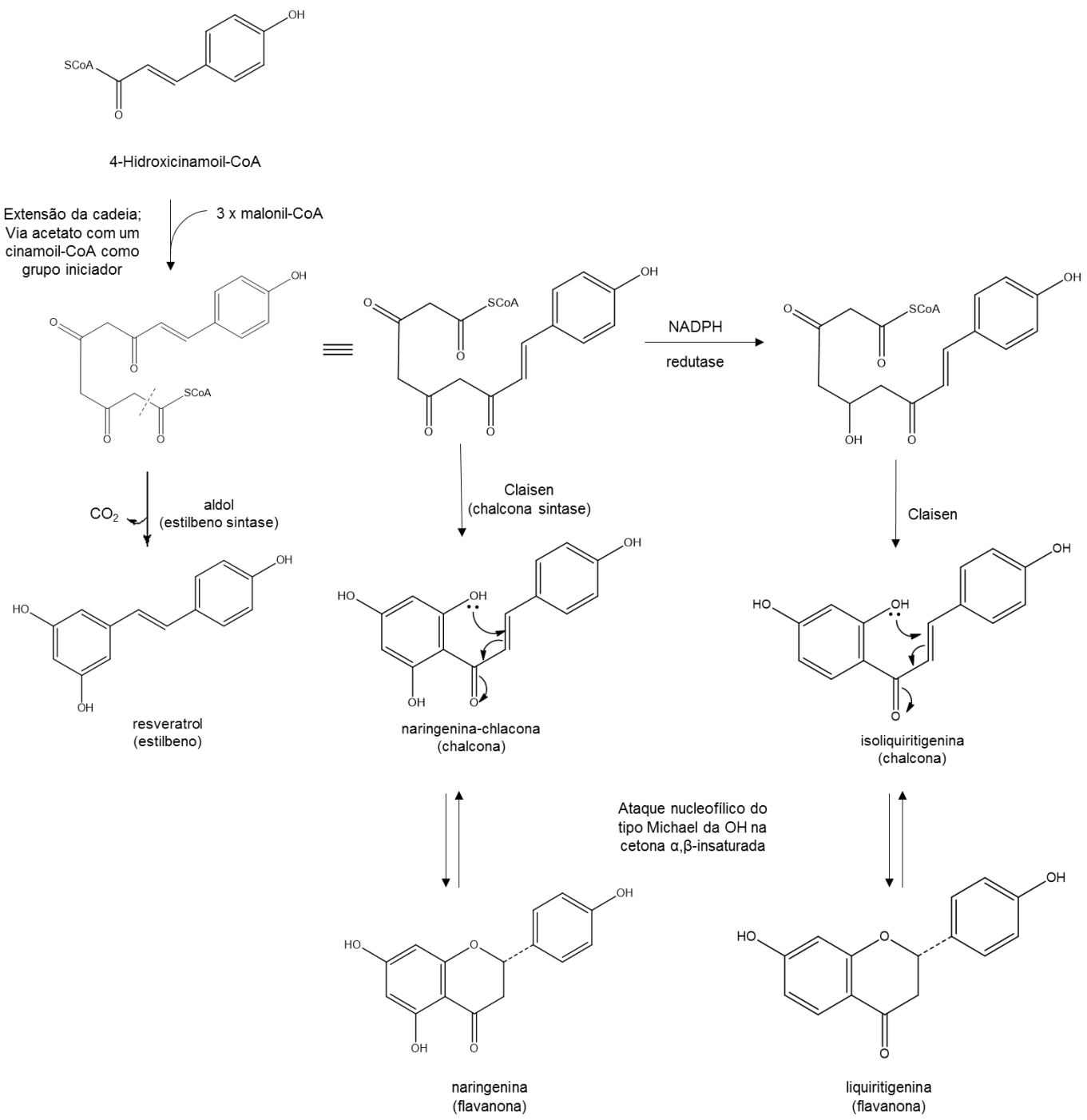
O interesse econômico pelos flavonoides é devido suas diferentes propriedades, como, por exemplo, o fato de alguns apresentarem cor e poderem ser usados como pigmentos, sua importância no processo de tanagem do couro, na fermentação do chá-da-índia, na manufatura do cacau e por conferirem valor nutricional para alguns alimentos. Além disso, esses compostos possuem também importância farmacológica, resultado de algumas propriedades atribuídas a alguns representantes da classe, como por exemplo antitumoral, anti-inflamatória, antioxidante, antiviral, entre outras (SIMÕES et al. 2000).

A tabela 1 mostra as principais classes de flavonoides e um resumo de suas propriedades farmacológicas importantes:

Tabela 1: Principais classes de flavonoides e algumas propriedades. Adaptada de SIMÕES (2010).

Classes	Número aproximado de estruturas conhecidas	Características
Flavonas, flavonóis e seus *O*-heterosídeos	1660	Co-pigmentação em flores; proteção contra raios UV em folhas
***C*-heterosídeos**	303	
Antocianos	256	Pigmentação do vermelho até o azul
Chalconas	197	Pigmentação amarela
Auronas	29	Pigmentação amarela
Di-hidroflavonóis	110	Estão presentes frequentemente em tecido de madeiras
Flavanonas	319	Podem apresentar sabor amargo
Di-hidrochalconas	71	Podem apresentar sabor amargo
Flavanas, leucoantocianidinas e protoancianidinas	309	Substâncias adstringentes
Isoflavonoides	630	Propriedades estrogênicas e/ou antifúngicas
Neoflavonoides	70	
Biflavonoides	134	Propriedades antifúngicas
Outras estruturas	100	

Os flavonoides são classificados em vários subtipos, sendo que a sua rota biossintética está esquematizada na próxima página (Fig. 4):


4-Hidroxicinamoil-CoA
Extensão da cadeia;
Via acetato com um
cinamoil-CoA como
grupo iniciador
3 x malonil-CoA
NADPH
redutase
CO_2
aldol
(estilbeno sintase)
Claisen
(chalcona sintase)
Claisen
resveratrol
(estilbeno)
naringenina-chlacona
(chalcona)
isoliquiritigenina
(chalcona)
Ataque nucleofílico do
tipo Michael da OH na
cetona α,β-insaturada
naringenina
(flavanona)
liquiritigenina
(flavanona)

(continuação)

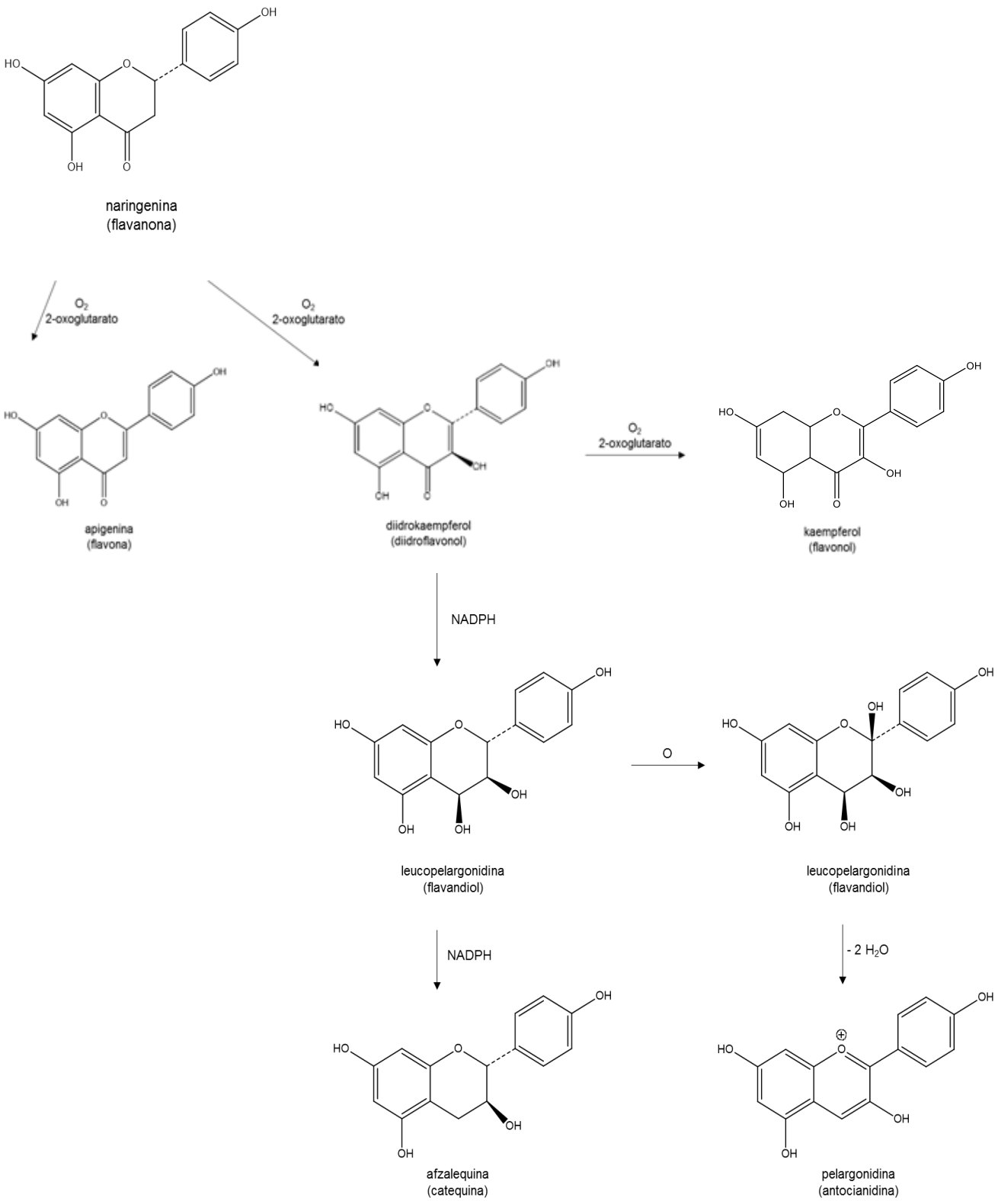


Figura 4: Biossíntese de flavonoides. Adaptada de DEWICK (2009).

Muitas técnicas de extração podem ser utilizadas para se obter extratos de plantas, principalmente constituídos por compostos fenólicos como os flavonoides.

Os métodos extrativos mais utilizados são: maceração, infusão, percolação, decocção, extração contínua quente (Soxhlet), extração em contra-corrente, extração assistida por microondas, ultra-som, fluido supercrítico e turbólise. Além dos métodos extrativos, são diversos os fatores que influenciam na extração, como a parte do material vegetal utilizada, a origem deste, o grau de processamento, o tamanho da partícula, o solvente utilizado, o tempo de extração, temperatura, polaridade e concentração do solvente (TIWARI et al., 2011).

Para extração de flavonoides utilizam-se geralmente solventes com polaridade crescente, utilizando na primeira extração solvente apolar, para retirar óleos, gorduras, esteróis e pigmentos facilitando a extração posterior dos flavonoides. A segunda extração utiliza-se solvente um pouco mais polar, como clorofórmio, diclorometano, acetato de etila ou éter etílico, permitindo recuperar as agliconas livres pouco polares, tais como flavonas, flavonóis, flavanonas, di-hidroflavonóis, isoflavonas e outras agliconas com alto grau de metilação. Aumentando a polaridade do solvente (acetona, metanol, água) se extraem as agliconas poli-hidroxiladas, flavonas e flavonóis mais polares, auronas, chalconas. Finalmente, a extração com água quente arrastará os heterosídeos mais polares, tais como os poliglicosídeos, flavonodióis, catequinas e procianidinas, e os açúcares. Em meio ácido podem-se extrair antocianinas e antocianidinas (SIMÕES et al., 2000).

Para separação de agliconas e heterosídeos uma alternativa é a extração em funil de separação utilizando primeiramente um solvente de menor polaridade, para separação das agliconas e, na sequência, extrair com solvente de maior polaridade para obtenção de heterosídeos (SIMÕES et al., 2000).

Muitas técnicas podem ser empregadas para identificação e separação de flavonoides, tais como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) , eletroforese capilar (EC), espectrometria UV-Visível, cromatografia em camada delgada (CCD), entre outras.

A cromatografia em camada delgada (CCD) é um método rápido e versátil, de separação de substâncias em misturas através da migração diferencial das mesmas, no qual a amostra interage com duas fases: uma estacionária e outra móvel (COLLINS, BRAGA e BONATTO, 1990).

A cromatografia em coluna é uma técnica bastante empregada no isolamento de produtos naturais e purificação de produtos de reações químicas. A fase estacionária pode ser de poliamida, celulose, sílica-gel e os vários tipos de Sephadex (COLLINS, BRAGA e BONATTO, 1990; ANDERSEN e MARKHAM, 2006).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é muito utilizada e bastante eficiente na separação de flavonoides, mesmo em misturas complexas (COLLINS, BRAGA e BONATTO, 1990).

O detector UV-Visível é o mais usado em CLAE para as análises de flavonoides, principalmente pelo fato destes compostos apresentarem duas bandas de absorção bem características no UV (YAO et al., 2004). Os espectros em metanol de flavonas e flavonóis exibem dois picos de absorção máximos entre 240-400nm. Considera-se que a Banda I está associada à absorção devido ao sistema cinamoil do anel B, e a Banda II com absorção envolvendo o sistema benzoil do anel A (MABRY *et al.*, 1970).

O CLAE pode estar acoplado à espectrometria de massas (*Mass Spectrometry* - MS), CLAE-MS, sendo um dos métodos mais sensíveis de análise molecular, uma vez que devido ao seu poder de separação por massas, é possível obter uma alta seletividade na análise (ANDERSEN e MARKHAM, 2006).

3.5. Atividade antioxidante

Os radicais de oxigênio e o ânion superóxido possuem papel importante nas reações do corpo humano. Contudo, se houver excesso na produção de radicais de oxigênio durante os processos patofisiológicos ou devido a fatores

ambientais adversos e não existirem antioxidantes disponíveis *in vivo*, podem ocorrer doenças e danos profundos em tecidos (MOLYNEUX, 2004).

Os flavonoides e outros derivados fenólicos são conhecidos por atuarem na captura e neutralização de espécies oxidantes como ânion superóxido (O^{2-}), radical hidroxila ou radical peróxido, atuando por sinergismo com outros antioxidantes como vitaminas C e E. Alguns flavonoides são capazes de se ligar a íons metálicos, impedindo-os de atuarem como catalizadores na produção de radicais livres. Esta atividade é o resultado de um conjunto de propriedades, tais como atividade quelante de ferro, atividade sequestrante de radicais livres, inibição das enzimas cicloxigenase, lipoxigenase, NADPH-oxidase, xantina-oxidase e fosfolipase, e estimulação de enzimas com atividade antioxidante como a catalase e a superóxido-dismutase. Assim, os flavonoides podem interferir nas reações de propagação e formação de radicais livres (TRUEBA e SANCHEZ, 2001). Sendo considerado um importante grupo antioxidante capaz de atuar no tratamento de doenças crônicas como aterosclerose e câncer.

4. METODOLOGIA

4.1. Coleta do material vegetal e obtenção do extrato

Foram coletadas folhas de *H. lupulus* em uma área de cultivo para a produção cervejeira localizada no bairro do Gamarra em Baependi - MG, em seguida foi confeccionada a exsicata e depositada no herbário Professor José Badini, DEBIO/ICEB/UFOP, sob o número de identificação OUPR 29768. A identificação da espécie foi realizada pelo Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza.

As folhas coletadas foram previamente secas em estufa de ar circulante Nova Ética® a 40°C, e posteriormente levadas à moagem em moinho de facas Manesco e Ranieri® LTDA; modelo MR 340, obtendo-se 119,5g. Após a pesagem foram submetidas a extração em ultrassom Unique® Ultra Cleaner 1600 utilizando o solvente etanol Alfatec® em ciclos de 30 minutos até a completa extração. Ao final de cada ciclo o solvente foi recuperado em rotaevaporador Fisatom®, sob pressão reduzida a 40°C. Ao final do processo extrativo, reuniu-se as frações e, após secagem em dessecador o material foi pesado para cálculo do rendimento. Em seguida, 10,39g do extrato foi submetido a uma partição com hexano e metanol:água para obtenção das frações hexânica (7,10g) e hidrometanólica (3,27g).

4.2. Determinação do perfil cromatográfico

A cromatografia em camada delgada (CCD) foi empregada para a identificação dos flavonoides totais no extrato bruto e nas as frações hidrometanólica e hexânica das folhas do *Humulus lupulus* L., utilizando como fase estacionária a placa de sílica gel Carvalhaes® e como fase móvel hexano Impex® e acetato de etila Alphatec® (6:4). As revelações foram feitas através de luz ultravioleta (254 e 366 nm) e NP-PEG (WAGNER e BLADT 1997).

A identificação do composto de interesse pode ser realizada através da comparação com um padrão e do fator de retenção R_f (COLLINS et al. 1990). Neste caso foi utilizada a rutina como padrão de comparação.

O extrato bruto das folhas do *Humulus lupulus* L. foi submetido a técnica CLUE/MSMS para identificação de flavonoides. A amostra foi filtrada em filtro de seringa de 0,2µm de porosidade e encaminhado para análise em um cromatógrafo líquido UPLC Acquity Waters® acoplado com espectrômetro de massas de captura de elétrons e ionizador químico à pressão atmosférica (APCI). A separação cromatográfica foi feita em coluna Acquity UPLC® BEH (1,7µm, 50x2mm d.i.) (Waters®). A fase móvel utilizada era composta de água:ácido fórmico 0,1% (solvente A) e acetonitrila:ácido fórmico 0,1% (solvente B), com protocolo de eluição 0-11minutos em gradiente linear de 5-95% B. O fluxo foi 0,3mL/min., e o volume de injeção da amostra de 4,0µL. Registrou-se o espectro de UV de 190-450nm.

As análises em espectrometria de massas foram realizadas com equipamento operando em modo negativo; voltagem do capilar, 3500 V; temperatura do capilar, 320ºC; voltagem da fonte, 5kV; temperatura do nebulizador 320ºC; corrente elétrica, 5 mA e gás de arraste nitrogênio, com pressão de 27 psi. As análises foram realizadas no modo full scan (100-2000 u). As análises ESI MS/MS foram feitas em um UPLC Acquity Waters®, com hélio como gás de colisão, com energia de colisão de 30eV. A análise em espectrômetro de massas foi feita em um analisador quadrupolo acoplado com uma fonte de eletronspray no modo negativo. Voltagem do íon spray: -4kV e voltagem da fenda -60V.

A detecção da presença e identificação de flavonoides no extrato etanólico bruto de folhas de *H. lupulus* foi realizada através da avaliação espectral dos principais picos eluidos, sendo selecionados aqueles com bandas de absorção no ultravioleta característicos de flavonoides (MABRY, et al 1970).

O fluxograma da metodologia está descrito a seguir na figura 5.

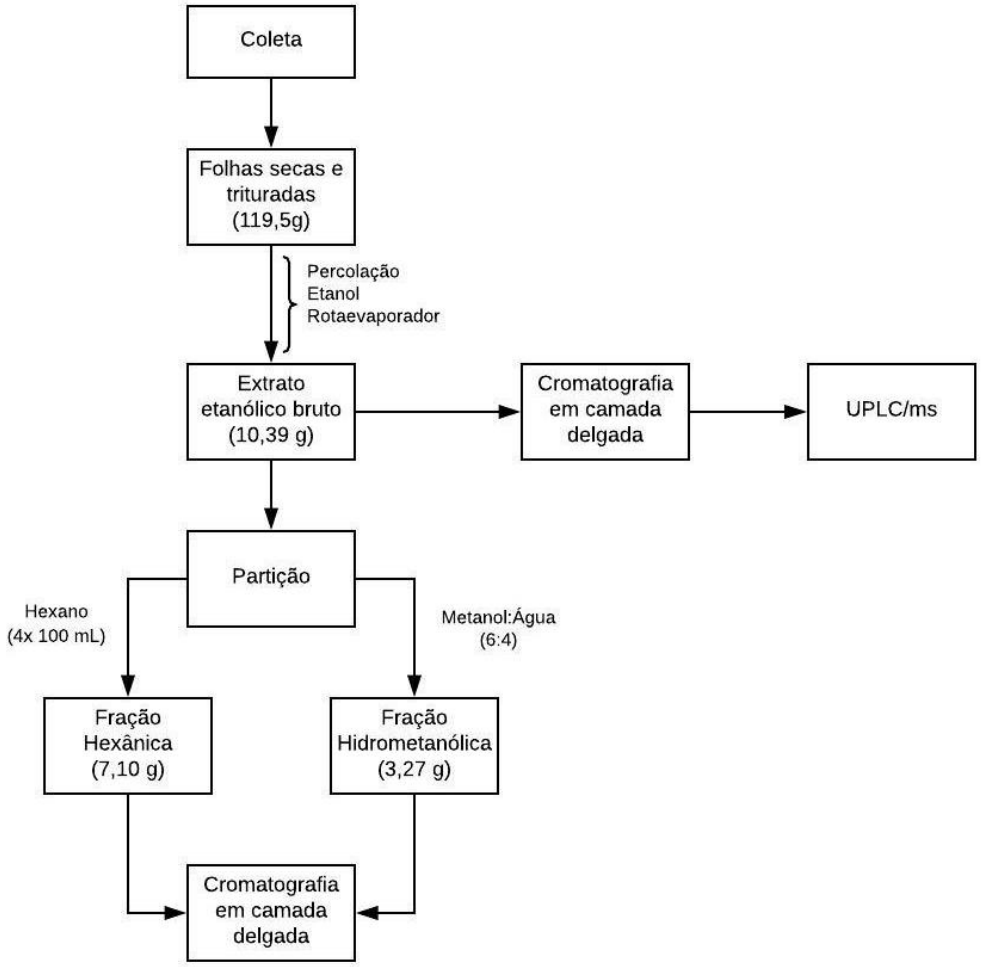


Figura 5: Fluxograma da metodologia de obtenção e análise fitoquímica do extrato etanólico bruto e frações de folhas de *Humulus lupulus*.

4.3. Determinação do teor de fenólicos totais

A determinação do teor de compostos fenólicos foi realizada de acordo com metodologia descrita por Bonoli et al. (2004) adaptada, utilizando-se o reagente de Folin-Ciocalteu, em microplaca em triplicata. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de ELISA a 650nm.

O método Folin-Ciocalteu tem como base a redução do ácido fosfomolibdico-fosfotungstico pelos grupos hidroxila dos compostos fenólicos, que produz um complexo de coloração azul, o qual absorve a 650nm. A intensidade da cor formada está diretamente correlacionada com o número de

grupos hidroxila ou grupos potencialmente oxidáveis presentes, sendo que as moléculas reduzidas dão a solução uma coloração azul, e as não reduzidas produzem a cor amarela. Para que os ânions molibdano e tungsofosfato produzam a oxidação é necessário que o grupo fenólico esteja na forma de fenolato. Para que isso seja possível, o meio deve ser alcalino e, para esse fim, o carbonato de sódio (Na_2CO_3) é adicionado. Apesar de ser largamente utilizado, esse método não é específico, já que detecta todos os grupos fenólicos presentes no extrato, incluindo proteínas extraíveis. Além disso, a interferência pela redução de substâncias como o ácido ascórbico pode ser considerada uma desvantagem (NACZK e SHAHIDI, 2004, com adaptações).

Para análise do teor de fenólicos foram preparadas, em triplicata, a partir dos extratos bruto e frações hexânica e hidrometanólica da folha de *H. lupulus*, soluções diluídas com etanol com a concentração de 2,5 mg/mL. Para a reação na microplaca, foram adicionados, nos poços destinados as amostras, 30 µL de água destilada, 80 µL de amostra, 10 µL do reagente de Folin-Ciocalteu agitando suavemente por 1 minutos, por último foram adicionados 40 µL de Na_2CO_3 e 40 µL de água destilada completando o volume do poço. Em seguida foram feitos brancos para todas as concentrações, os quais eram constituídos somente por 120 µL de água destilada e 80 µL de amostra. E por fim construída uma curva padrão com concentrações de 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300 e 350 µg/mL, sendo para isso necessário a adição de ácido gálico e água destilada em diferentes volumes de modo a obter a concentração determinada, finalizando com a adição de 10 µL do reagente de Folin-Ciocalteu, 40 µL de Na_2CO_3 e 40 µL de água. O teor de fenólicos totais pôde ser determinado através da interpolação da absorbância das amostras contra a curva de calibração construída com padrões de ácido gálico.

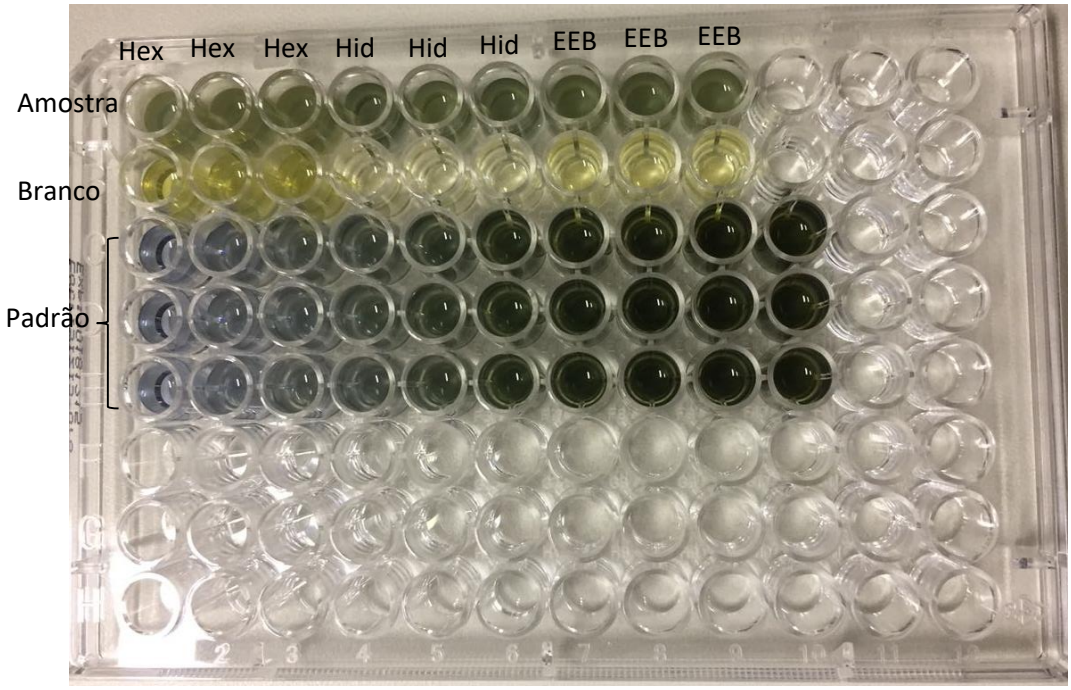


Figura 6: Microplacas para quatificação do teor de fenólicos totais das folhas de *Humulus lupulus*.

4.4. Determinação do teor de flavonoides

O teor de flavonoides totais foi determinado pelo método descrito por Chang et al. (2002), com algumas modificações. A técnica baseia-se na medida da absorbância, a 450 nm, no leitor de ELISA do complexo formado entre o flavonoide e o alumínio do reagente de cor, formando compostos de coloração amarelada. O teor de flavonoides foi calculado a partir da equação da curva de calibração obtida através de dez diluições do padrão de rutina.

Para análise do teor de flavonoides foram preparadas, em triplicata, a partir do extrato bruto e frações hexânica e hidrometanólica da folha de *H. lupulus*, soluções diluídas com etanol com a concentração de 2,5 mg/mL. Para a reação na microplaca, foram adicionados, nos poços destinados as amostras, 40 µL de etanol, 100 µL de amostra, 4 µL de $AlCl_3$, 4 µL da solução de CH_3COOK e 52 µL de água destilada completando o volume do poço. Em seguida foram feitos brancos para todas as concentrações, os quais eram constituídos por 100 µL de amostra, 44 µL de etanol, 4 µL CH_3COOK e 52 µL de água destilada. E por fim construída uma curva padrão com concentrações de 2, 5, 10, 1, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 µg/mL, sendo para isso necessário a adição de rutina e etanol em diferentes volumes de modo a obter a concentração determinada, finalizando com a adição de 10 µL do reagente de Folin-Ciocalteu, 40 µL de Na_2CO_3 e 40 µL de água4 µL de $AlCl_3$, 4 µL da solução de CH_3COOK e 52 µL de água destilada. O teor de flavonoides totais pôde ser determinado através da interpolação da absorbância das amostras contra a curva de calibração construída com padrões de rutina.

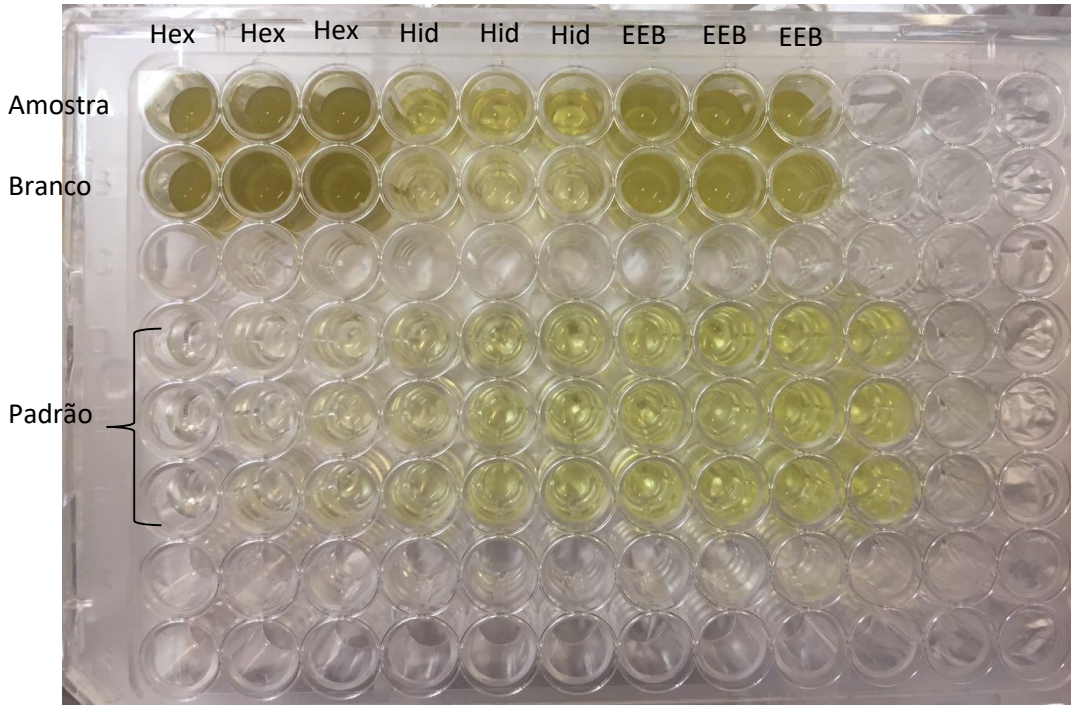


Figura 7: Microplacas para quatificação do teor de flavonoides totais das folhas de *Humulus lupulus*.

4.5. Determinação da atividade antioxidante

A determinação da atividade antioxidante foi realizada a partir do método descrito por Rufino et al. (2007), que constitui na transferência de elétrons onde, por ação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar, o DPPH que possui cor púrpura é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com consequente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância. A partir dos resultados obtidos foi determinada a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres.

Primeiramente foram preparadas as soluções diluídas em etanol com concentração de 400 µL/mL dos extratos bruto e das frações hexânica e hidrometanólica em balões volumétricos de 25 mL.

Para a elaboração do DPPH, foi preparada uma solução de 0,002g de DPPH, em etanol p.a. utilizando um balão de 50 mL protegido da luz.

Para determinar a linearidade foi construída a curva padrão com as concentrações 200, 180, 160, 140, 120, 100, 80, 60, 40 e 20 µg/mL, sendo para isso necessário a adição do padrão rutina e etanol em diferentes volumes de modo a obter a concentração determinada, finalizando com a adição de 100 µL/mL de DPPH.

Também foi preparado o branco para todas as concentrações, onde os 100 µL/mL de DPPH foram substituídos por etanol. E um controle negativo foi feito em triplicata pela adição de 150 µL/mL etanol e 100 µL/mL da solução de DPPH.

Todas as concentrações foram realizadas em triplicata. As amostras foram incubadas por 30 minutos após a adição do DPPH. Na sequência foram feitas as leituras das absorbâncias no comprimento de onda de 490nm em leitor de ELISA. O cálculo da porcentagem de atividade antioxidante foi realizado através da determinação de IC_{50}.

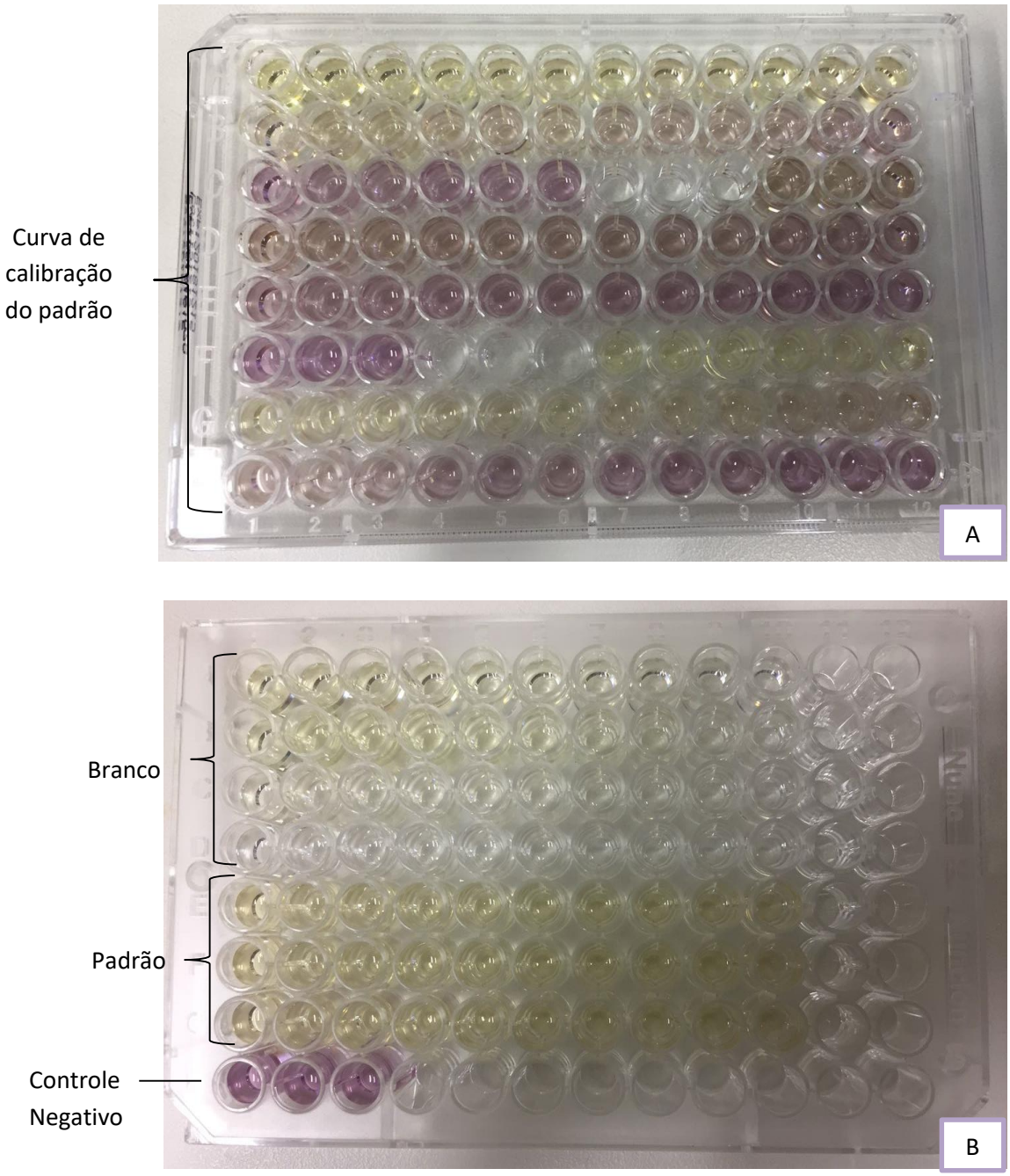


Figura 8: A e B: Microplacas da determinação da atividade antioxidante das folhas de *Humulus lupulus*.

5. RESULTADOS

O revelador NP/PEG, sob irradiação a 366 nm, permitiu observar na placa a fluorescência de cor amarela presentes no extrato bruto e na fração hidrometanólica conforme a placa 1 na figura 9. O ganho de fluorescência após a aplicação do revelador é determinado pelo número e posição dos substituintes dos flavonoides. A cor amarela indica a presença do grupo OH nas posições 3' e 4' (PEREIRA, 2002).

Figura 9: Análise por CCD do extrato etanólico bruto e frações. Eluente: hexano:acetato de etila (6:4) e revelador: NP/PEG.

O extrato etanólico bruto foi filtrado e enviado para análise em UPLC/MSMS. O espectro *full scan* está demonstrado a seguir (Figura 10).

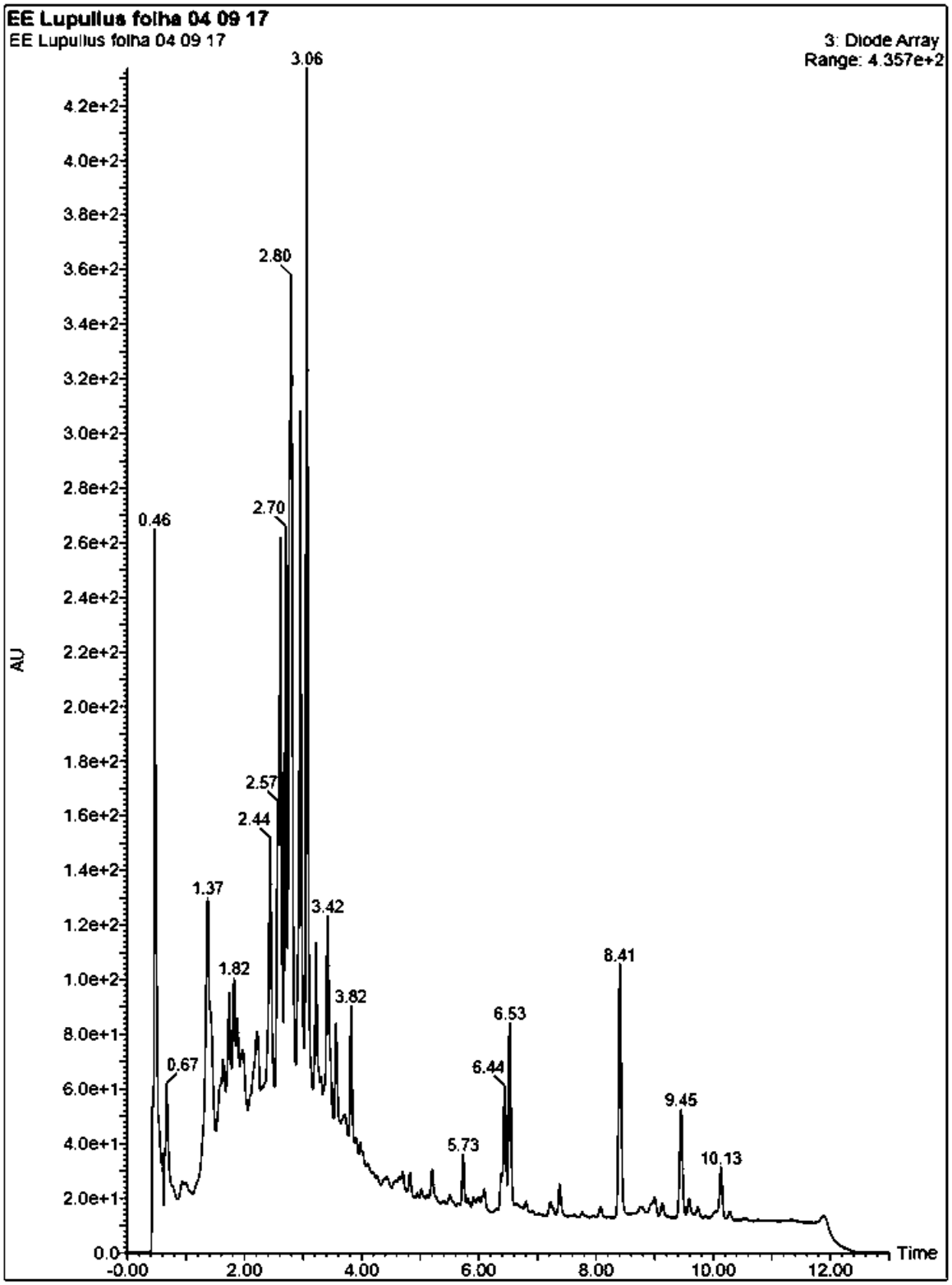


Figura 10: Cromatograma do extrato etanólico bruto de folhas de *Humulus lupulus* L..

Os tempos de retenção (TR) selecionados para posterior análise foram 2,832, 2,618 e, 2,628 min., devido seus espectros de UV serem característicos de flavonoides. Segundo SIMÕES et al. (2000), os flavonoides possuem espectros de absorção característicos no ultravioleta, determinado pelo núcleo comum da benzopirona, com dois máximos de absorção: um ocorrendo entre 240-285 nm (banda II) e outro entre 300-400 nm (banda I).

O tempo de retenção 2,832 min. foi selecionado devido a presença de um espectro UV característico de flavonoides como se pode observar na figura abaixo.

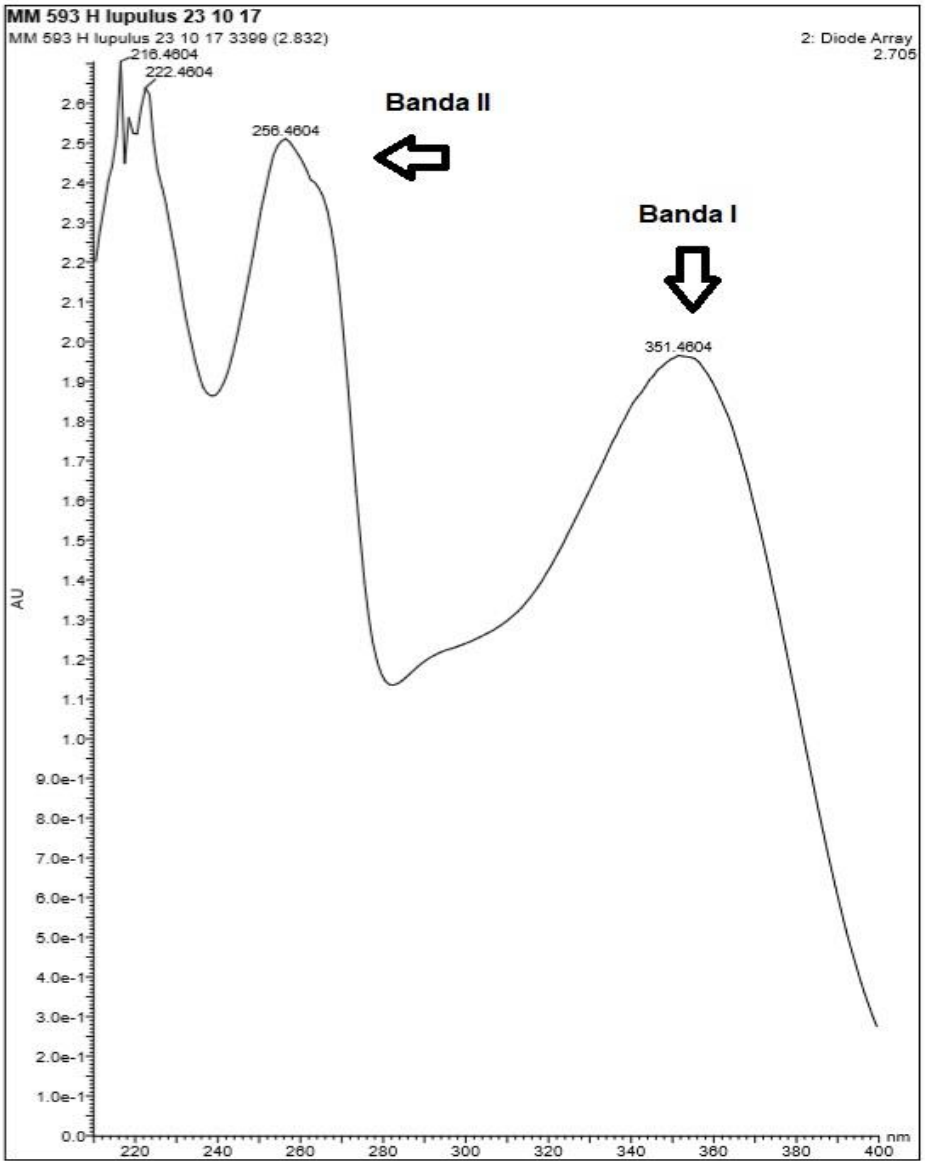


Figura 11: Espectro de UV da substância 1 de TR: 2,832 min do extrato etanólico bruto de folhas de *Humulus lupulus* L.*.*

O espectro de UV demonstrado anteriormente (Figura 11), sugere se tratar de um flavonol, uma vez que a banda I para flavonois ocorre entre 352-385 nm, segundo SIMÕES et al. (2000).

O espectro de massas mostra (Figura 12), devido a fragmentação, o flavonol canferol-3-*O*-rutinosideo. Em sua fragmentação ocorre a perda de açúcar, o que caracteriza um flavonoide *O*-heterosídico. Como sua fragmentação foi no modo negativo no espectrômetro de massas, e sua *m/z* foi 593, pode-se concluir que sua massa molecular é 594 g/mol.

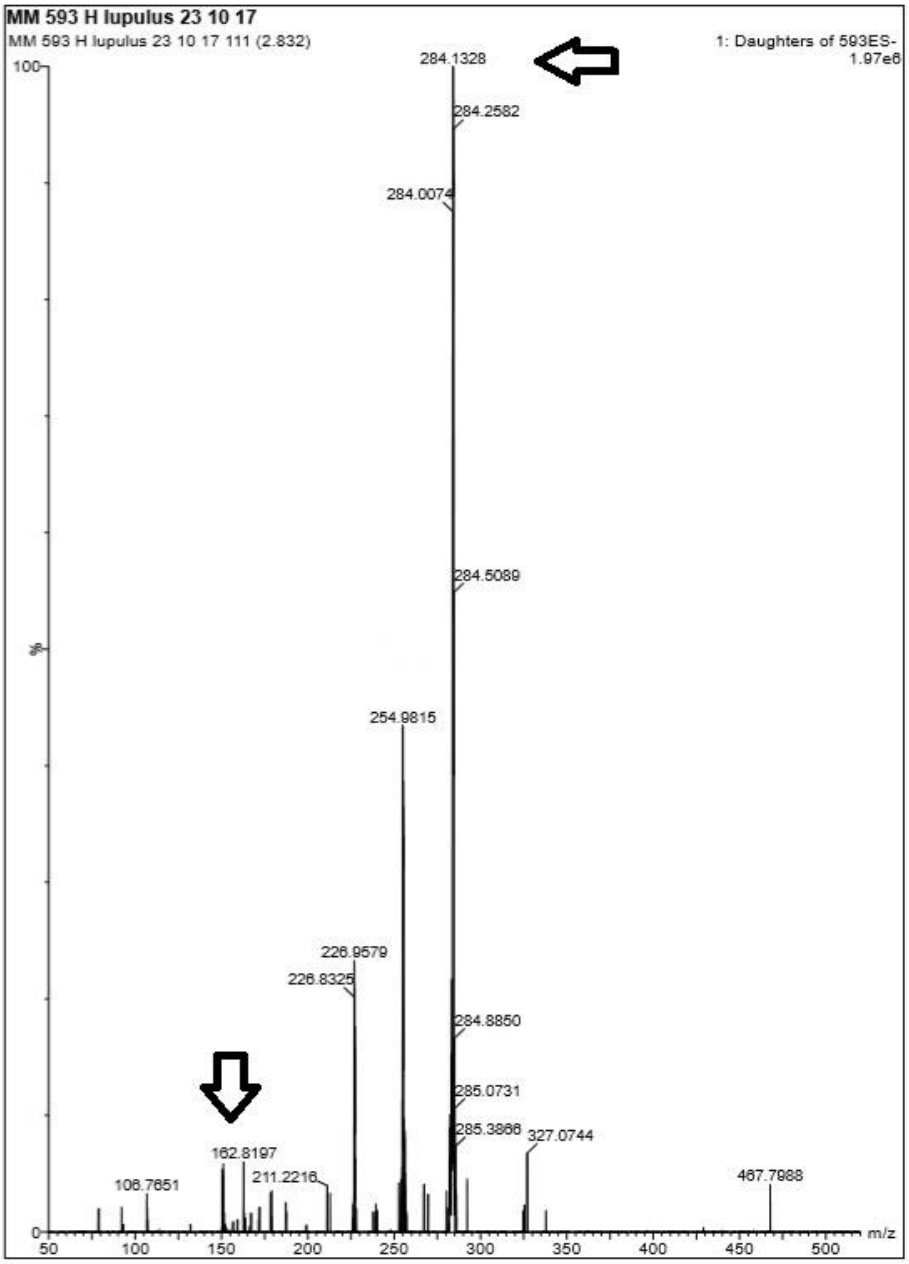


Figura 12: Espectro de massas TR: 2,832 min do extrato etanólico bruto de folhas de *Humulus lupulus* L*.*.

A proposta de fragmentação da substância de *m/z* 593 está demonstrada abaixo:

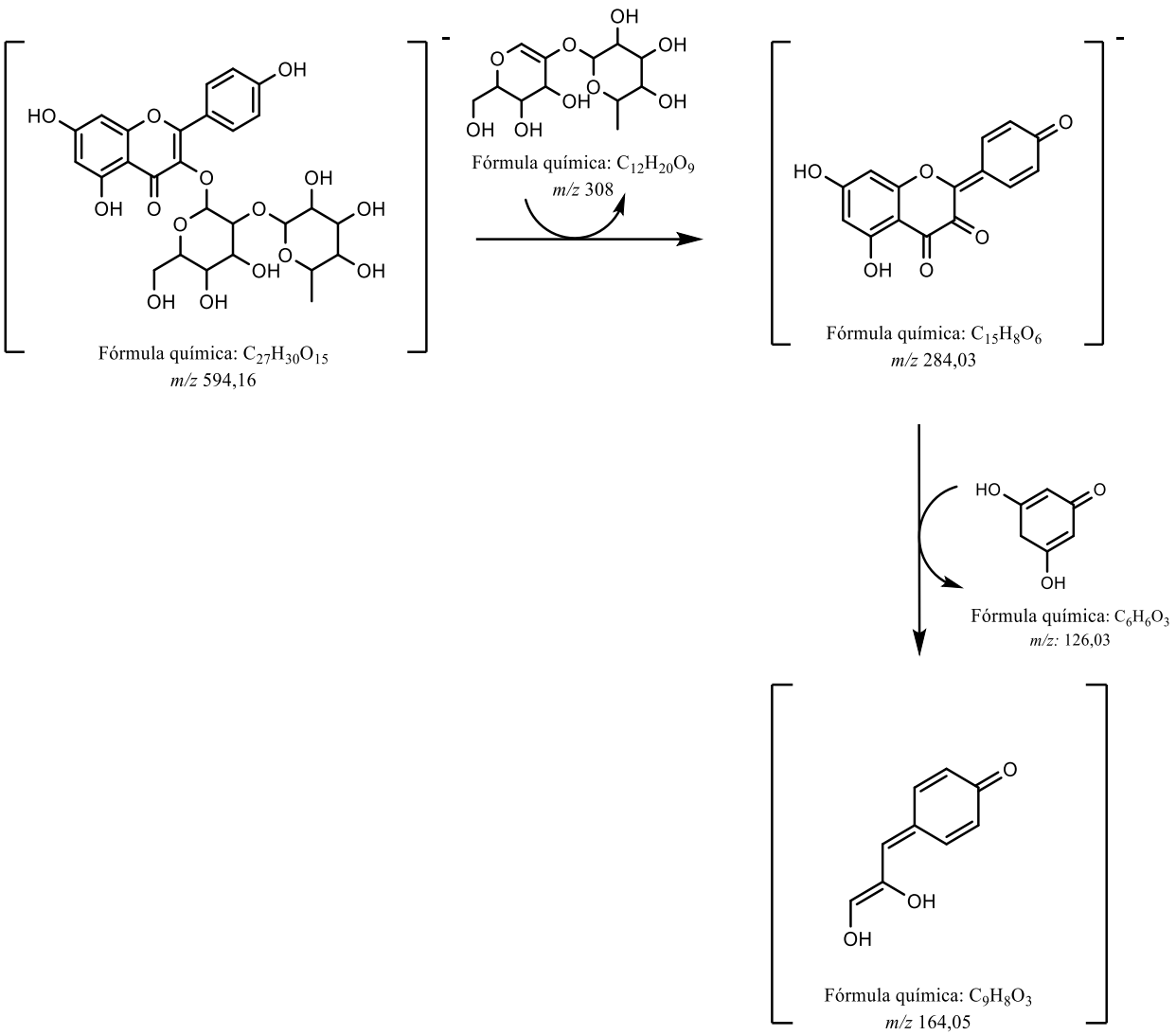


Figura 13: Proposta de fragmentação da substância 1, com TR: 2,832 min do extrato etanólico bruto de folhas de *Humulus lupulus* L.*.*

A substância de tempo de retenção 2,618 min. se trata da substância com *m/z* 609, e massa molar 610 g/mol pois sua fragmentação ocorreu em modo negativo no espectrômetro de massas.

O espectro UV (Figura 14), é característico de flavonoide do tipo flavonol, uma vez que a banda I para flavonois ocorre entre 352-385 nm, segundo SIMÕES et al. (2000).

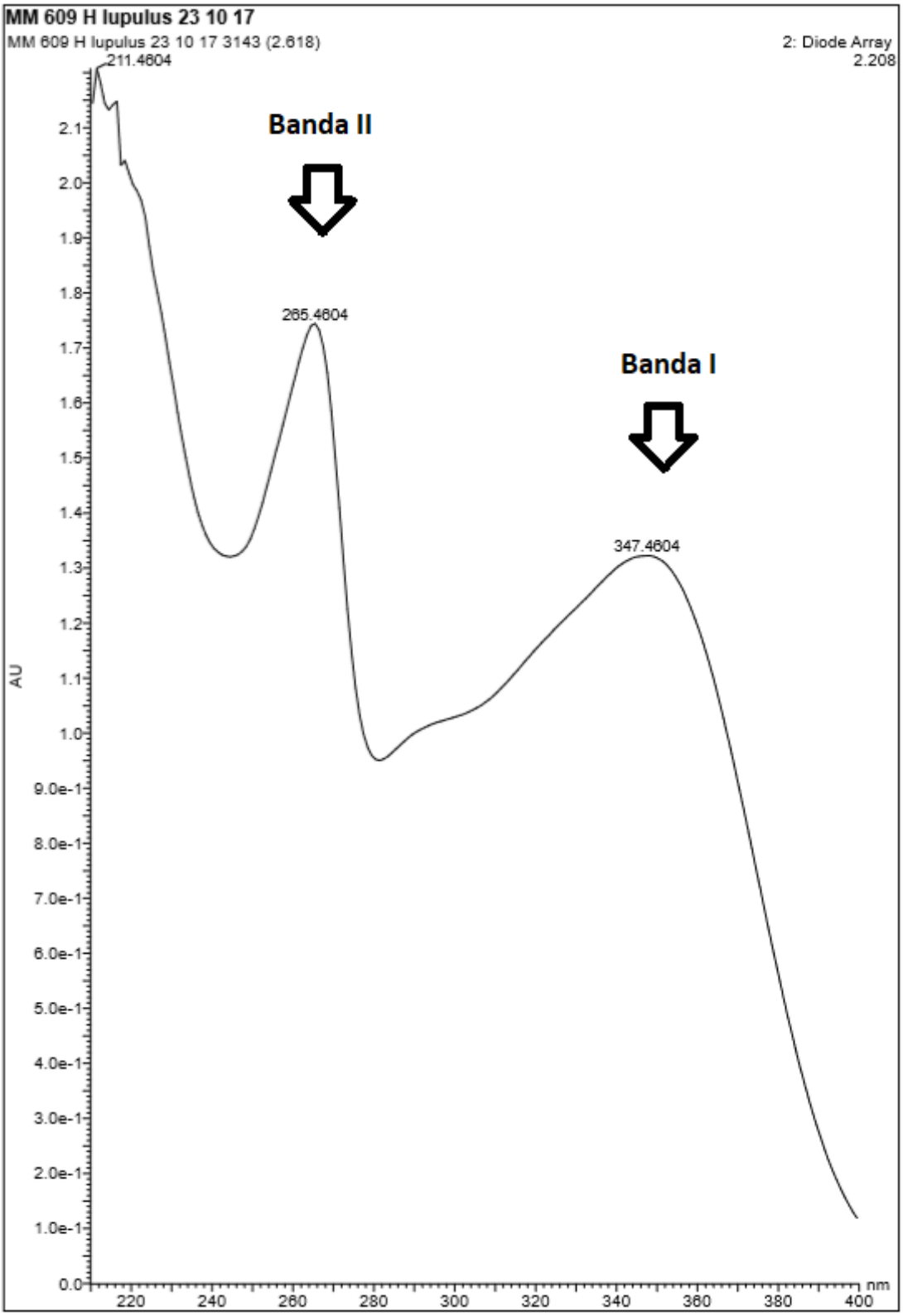


Figura 14: Espectro de UV da substância 2, com TR: 2,618 min do extrato etanólico bruto das folhas de *Humulus lupulus* L..

O espectro de massas mostra (Figura 15), devido a fragmentação, a Quercetina-3-*O*-rutinosídeo (Rutina). Em sua fragmentação ocorre a perda de açúcar, o que caracteriza um flavonoide *O*-heterosídico.

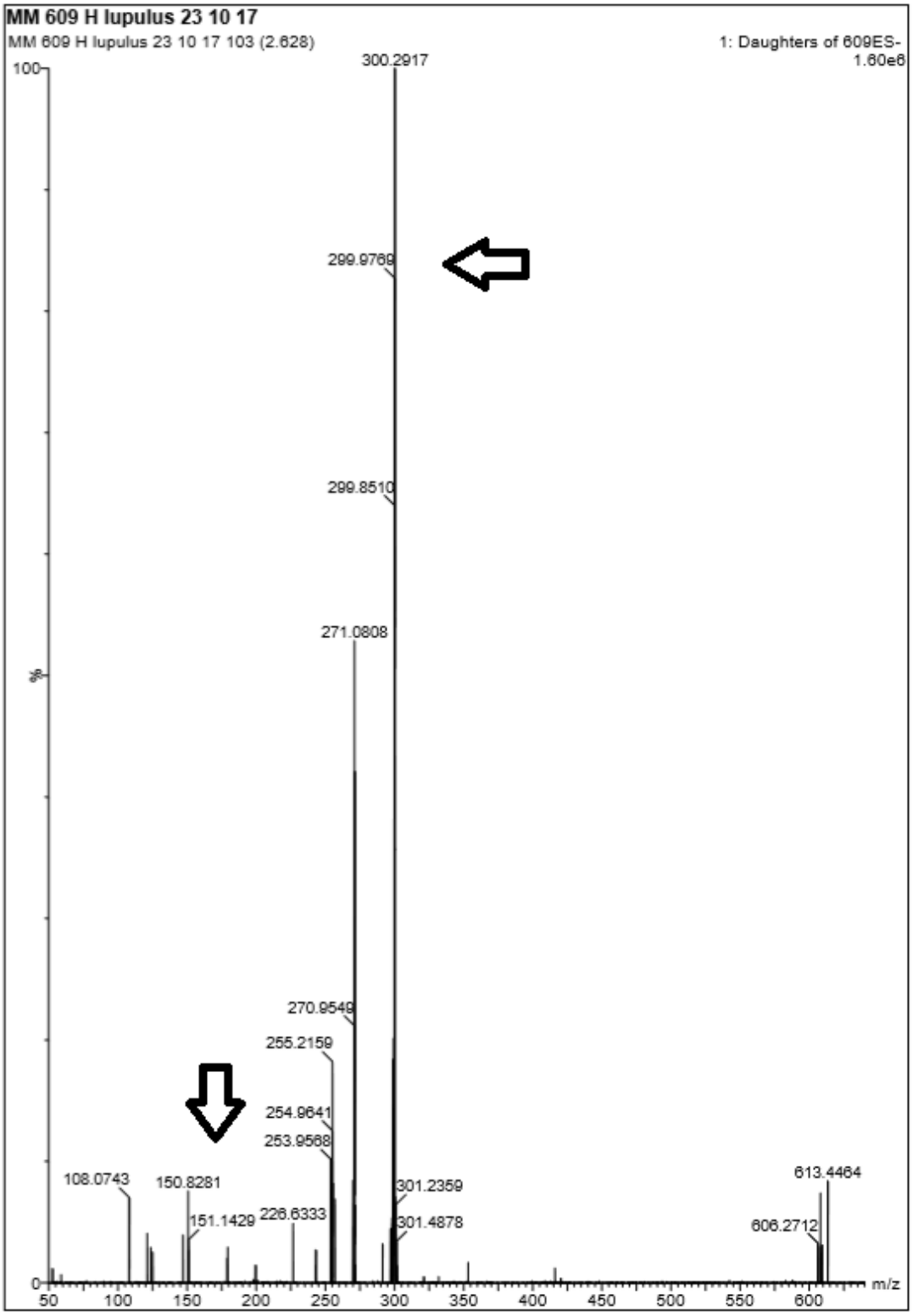


Figura 15: Espectro de massas TR: 2.618 min do extrato etanólico bruto de folhas de *Humulus lupulus* L.

A proposta de fragmentação da substância de massa 609 *m/z* está demonstrada abaixo:

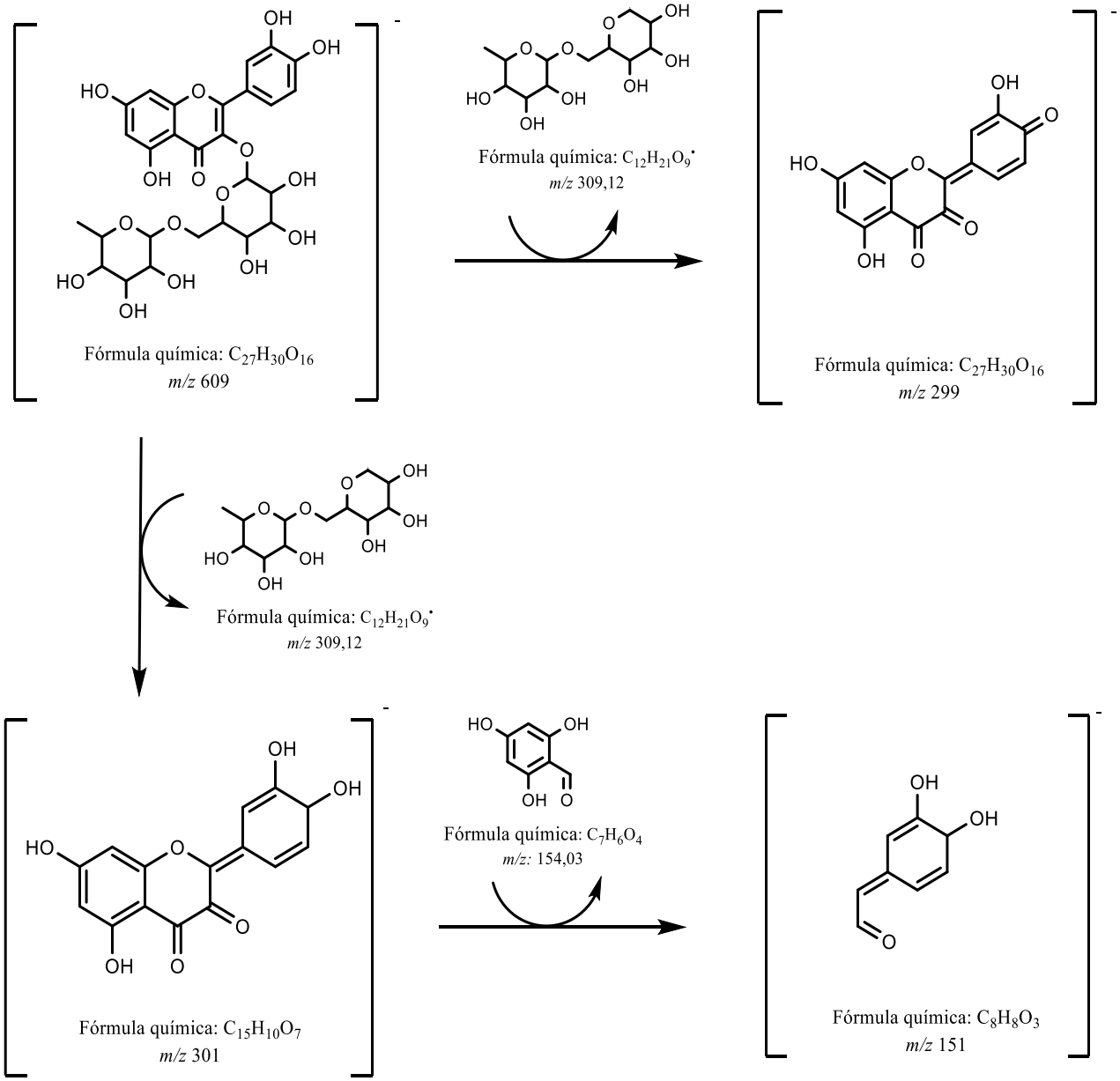


Figura 16: Proposta de fragmentação substância 2, com TR: 2,618 min da fração do extrato bruto da folhas do *Humulus lupulus* L.

A substância 3 é aquela com TR 2,628 min e razão *m/z* 739 g/mol. Seu espectro de UV é demonstrado abaixo (Figura 13):

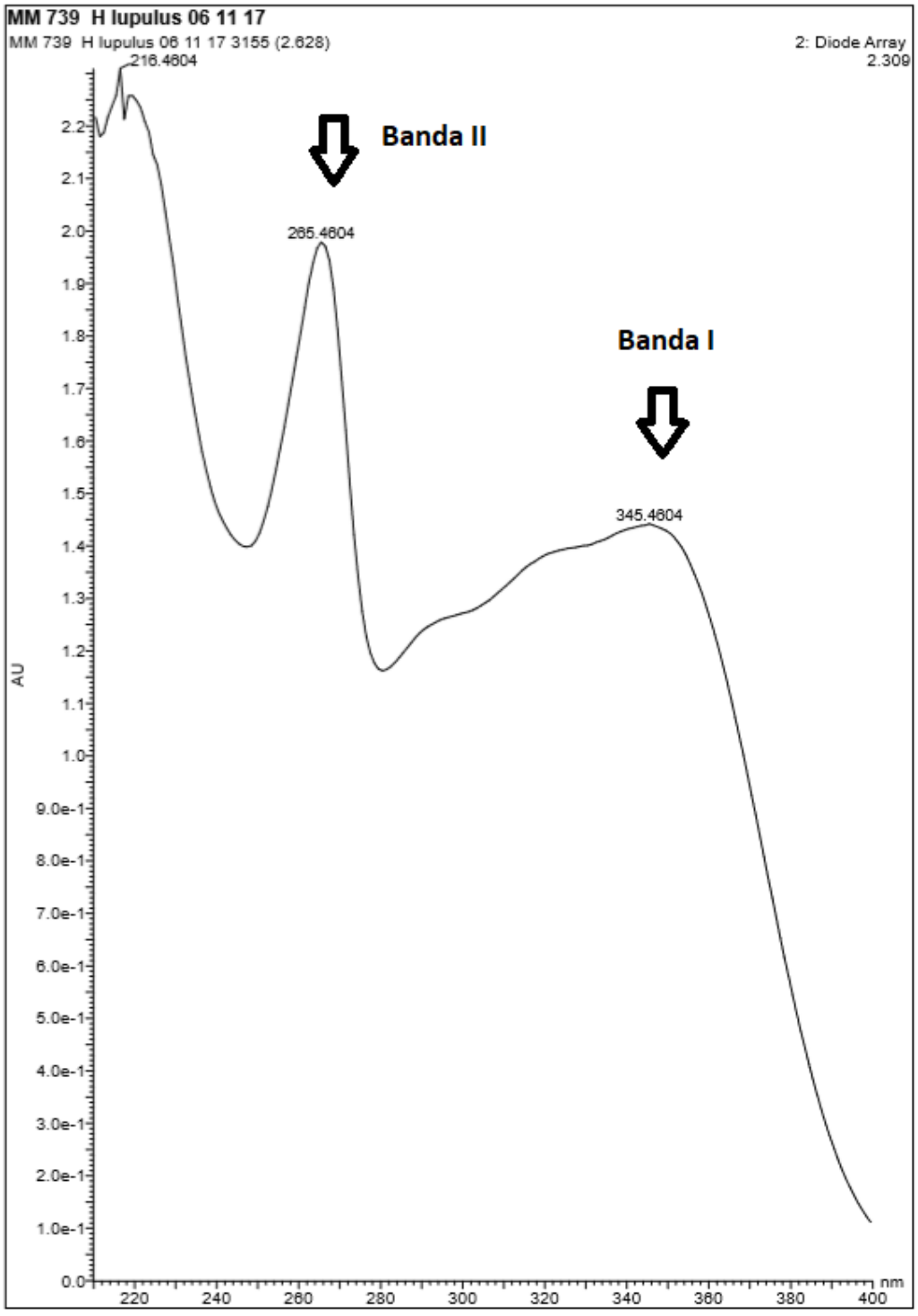


Figura 17: Espectro de UV da substância 3, com TR: 2,628 min do extrato etanólico bruto das folhas de *Humulus lupulus* L.

O espectro de UV da substância 3*, m/z* 739 demonstra que pode se tratar de uma flavona, uma vez que a banda I para flavonas ocorre entre 304-350 nm, segundo SIMÕES et al. (2000).

No espectro de massas da substância 3 (Figura 18) é possível observar que se trata de um O-heterosídeo denominado Caempferol-3-*O*-robinosídeo-7-raminosídeo, devido a suas fragmentações características, como perda de molécula de açúcar. Como sua fragmentação foi no modo negativo no espectrômetro de massas, e sua *m/z* foi 739, pode-se concluir que sua massa molecular é 740 g/mol.

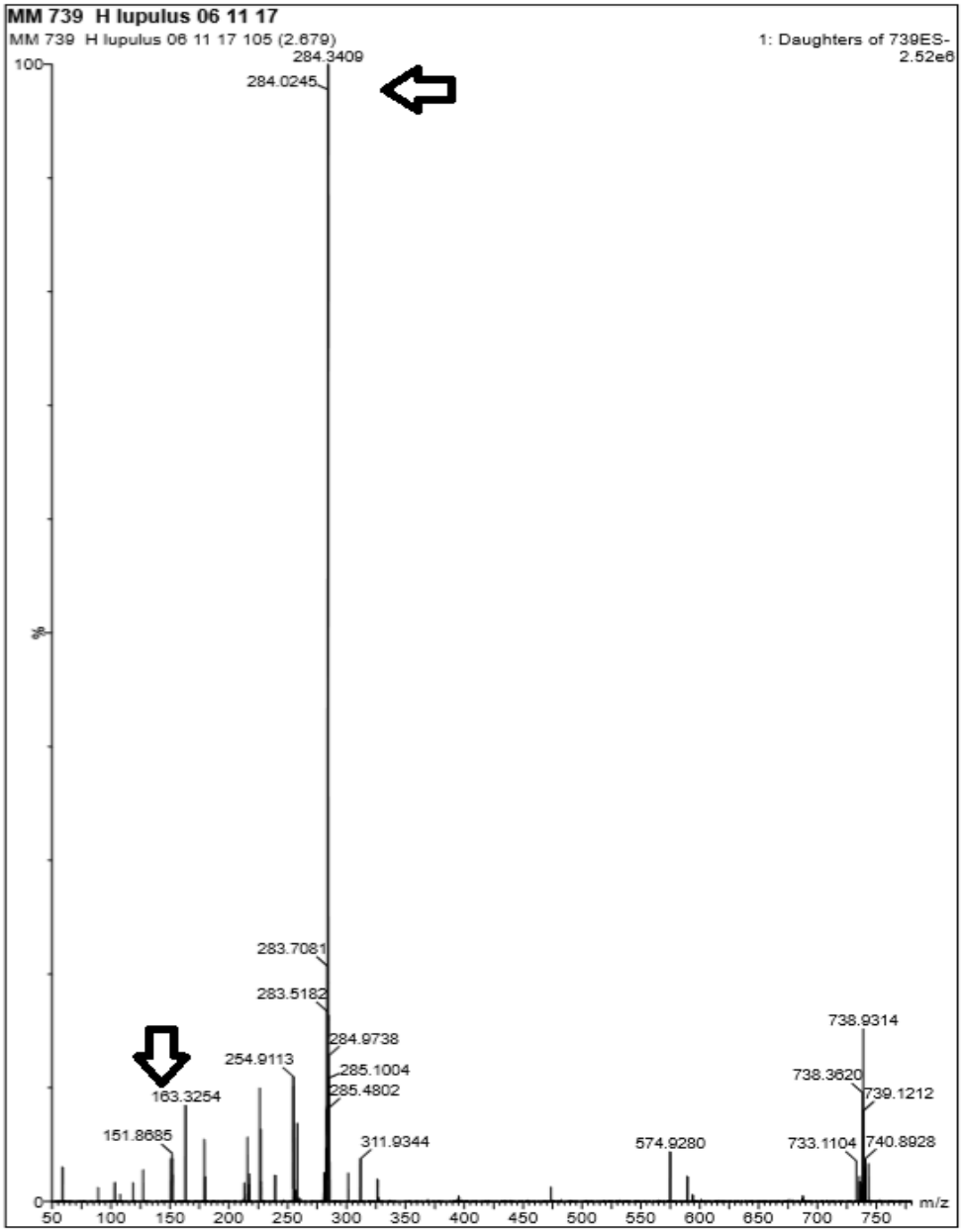


Figura 18: Espectro de massas TR: 2,628 min do extrato etanólico bruto de folhas de *Humulus lupulus* L.

A proposta de fragmentação da substância de massa *m/z* 740 está demonstrada abaixo:

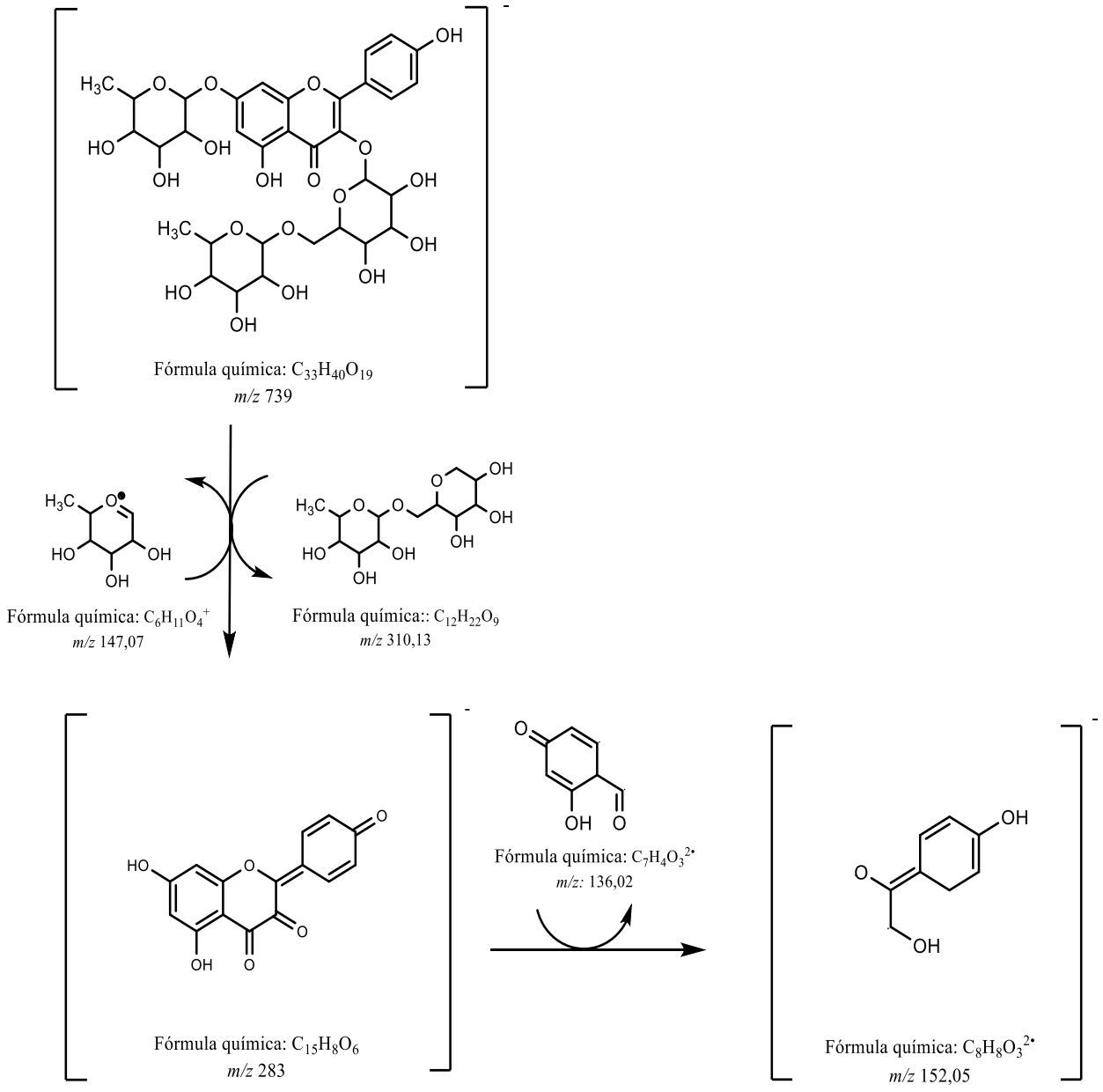


Figura 19: Proposta de fragmentação substância 3, com TR: 2.628 min da fração do extrato bruto da folhas do *Humulus lupulus* L..

7.2. Determinação do teor de fenólicos totais

Para a quantificação dos fenólicos utilizou-se os valores de absorbância encontrados para as diferentes concentrações do padrão de ácido gálico para a construção da curva analítica. A equação encontrada foi Y= 0,0063x + 0,1277 tendo R^2 = 0,9978. A partir disso o valor de concetração média para o extrato etanólico bruto foi 75,4053 ± 8,04 mg EAG/g de amostra, para hidrometanólica 91,8497 ± 7,29 mg EAG/g de amostra e para fração hexânica não foi significativo.

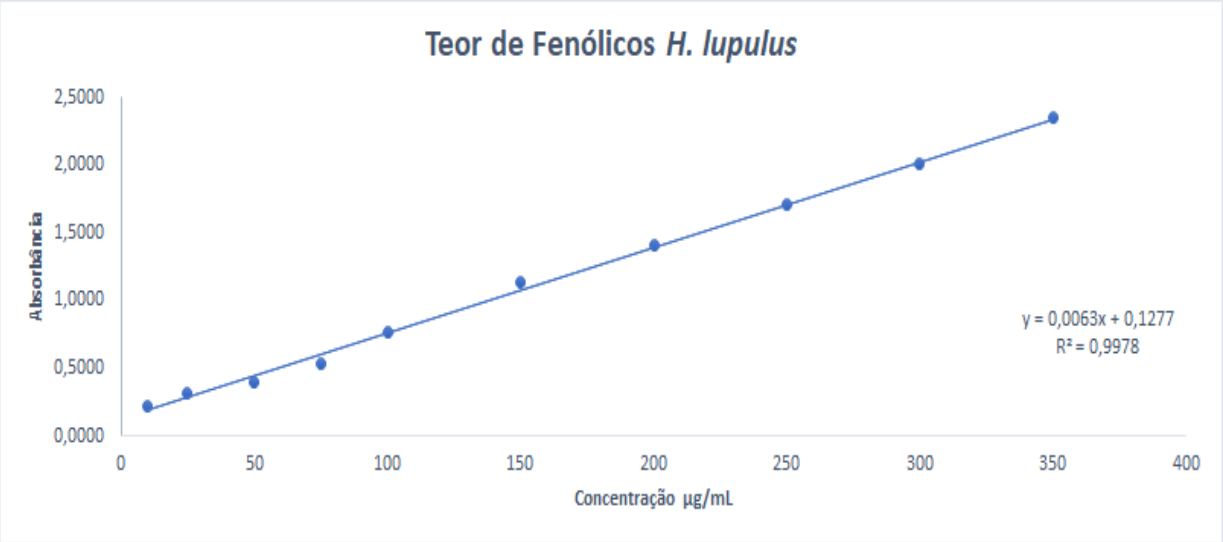


Figura 20: Gráfico - Curva analítica de ácido gálico para determinação do teor de fenólicos no extrato etanólico bruto e frações hexânica e hidrometanólica das folhas de *Humulus lupulus* L.

7.3. Determinação do teor de flavonoides totais

Para a quantificação dos flavonóides utilizou-se os valores de absorbância encontrados para as diferentes concentrações do padrão de rutina para a construção da curva analítica. A equação encontrada foi Y= 0,0094x + 0,0383, tendo R^2 = 0,9884. A partir disso o valor de concetração média para o extrato etanólico bruto foi 0,96596 ± 0,12 mg ER/g de amostra, para hidrometanólica 4,6712 ± 0,67 mg ER/ g de amostra e para fração hexânica não foi significativo.

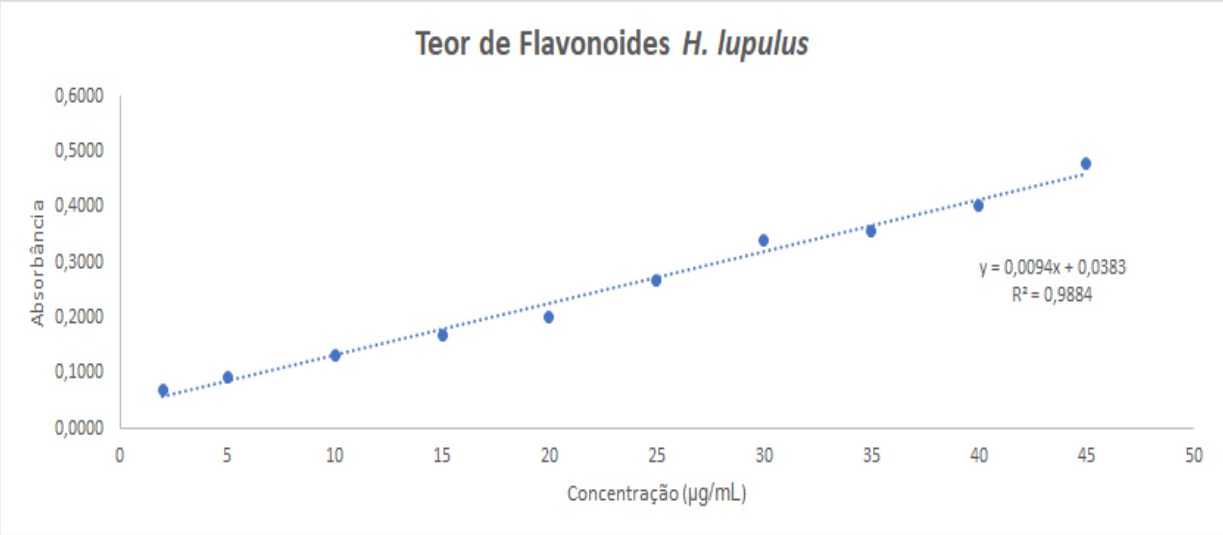


Figura 21: Gráfico - Curva analítica de rutina para determinação do teor de flavonoides no extrato etanólico bruto e frações hexânica e hidrometanólica das folhas de *Humulus lupulus* L..

7.4. Determinação da atividade antioxidante

Com o objetivo de avaliar a capacidade dos constituintes do extrato etanólico bruto e frações da folha de *H. lupulus* em capturar radicais livres (DPPH) foi realizada análise da solução destes com DPPH. Os resultados foram expressos em percentagem de inibição de oxidação, ou seja, a porcentagem de atividade antioxidante é correspondente à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante. Quanto maior o consumo de DPPH pela amostra, maior é sua atividade antioxidante (AA%) (ALVES et al., 2007).

Com os valores obtidos foi construído um gráfico de porcentagem (%) de inibição X concentração em µg/mL. Para o cálculo do IC_{50}foi utilizada a equação da reta, substituindo o valor de y por 50 para obtenção da concentração da amostra com capacidade de reduzir 50% do DPPH.

A correlação entre a porcentagem de inibição e a concentração do extrato bruto resultou em um gráfico com equação da reta Y= 0,3870x + 9,1316 e R^2= 0,932, o que forneceu um IC_{50} de 105,60µg/mL, que é a concentração de extrato necessária para reduzir em 50% a ação oxidante do DPPH.

Para a fração hidrometanólica a equação da reta resultante foi Y= 0,3092x + 10,817 e R^2 = 0,9252, o que forneceu um IC_{50} de 126,72µg/mL.

A equação resultante da fração hexânica foi Y = 0,0705x + 2,3623 e R^2 = 0,9057, o que forneceu um de IC_{50}= 675,71µg/mL.

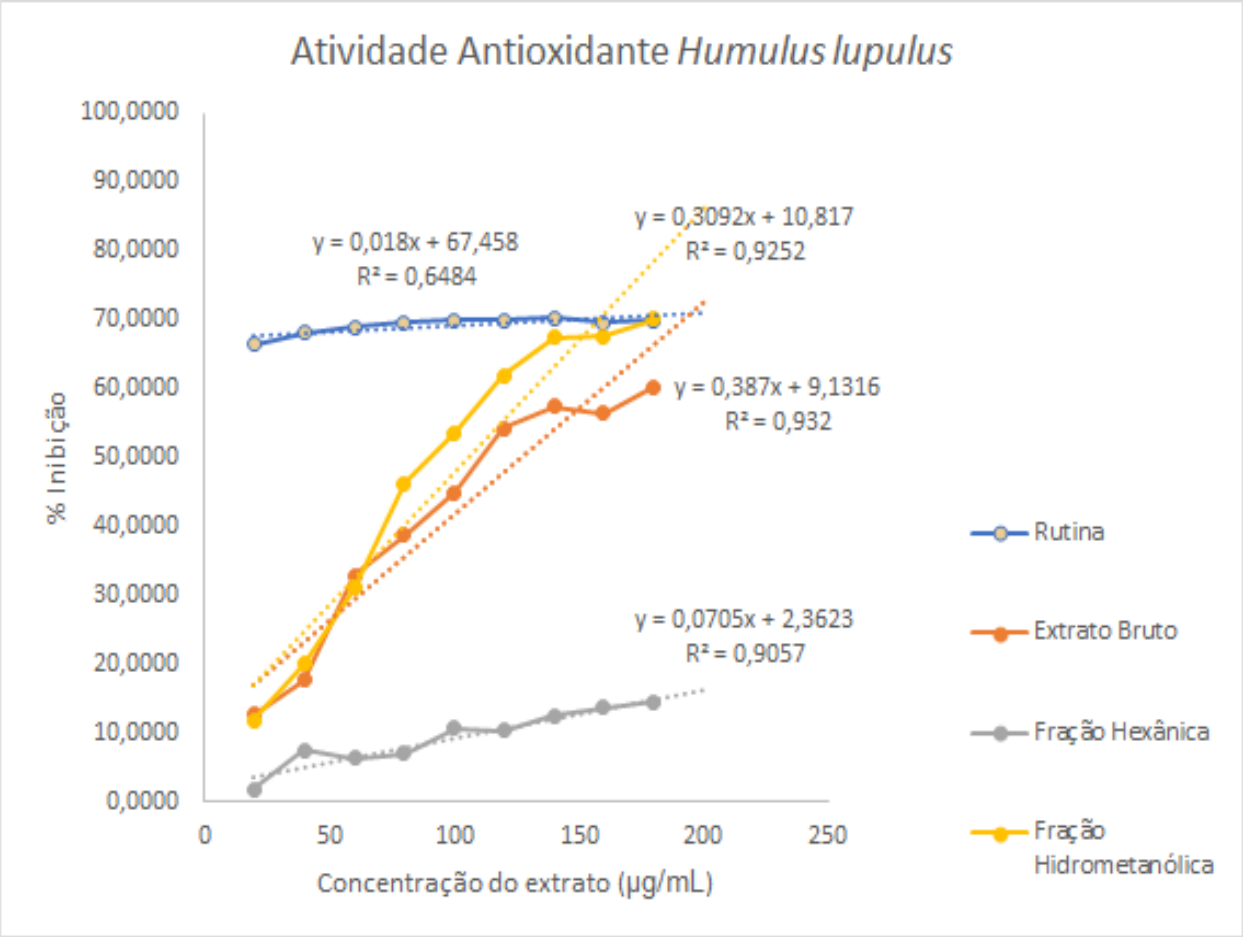


Figura 22: Gráfico - Curva analítica de DPPH para quantificação do IC_{50} do extrato bruto e frações hexânica e hidrometanólica das folhas de *Humulus lupulus* L..

6. DISCUSSÃO

Segundo ANDERSEN e MARKHAM (2006), os flavonoides de menor polaridade, como isoflavonas, flavanonas, flavonas metiladas e flavonóis, são extraídos com clorofórmio, diclorometano, éter dietílico ou acetato de etila, enquanto que flavonoides glicosilados e agliconas de maior polaridade são extraídos com álcoois ou com misturas de álcool-água. Na extração, o solvente é escolhido segundo a subclasse de flavonoide pesquisada. Sendo assim, os flavonoides foram encontrados no extrato bruto e na fração hidrometanólica devido a sua polaridade. A fração hexânica, por possuir baixa polaridade não permitiu a extração dessa classe de metabólitos secundários, isso pôde ser observado pela revelação da placa cromatográfica com NP/PEG sob irradiação da luz UV.

O NP/PEG permite a identificação de flavonoides (WAGNER e BLADT, 1997). O ganho de fluorescência após a aplicação do revelador é determinado pelo número e posição dos substituintes dos flavonoides. A cor amarela indica a presença do grupo OH nas posições 3' e 4' (PEREIRA, 2002).

Os flavonoides mais comumente identificados em *H. lupulus*, sobretudo em seus cones, são chalconas e flavonoides glicosilados, como caempferol, quercetina, quercitrina e rutina (SÄGESSER & DEINZER, 1996). Flavonoides prenilados também foram identificados nos cones do lúpulo, dando destaque a chalcona xanthohumol (cerca de 1% do peso seco) (STEVENS et al., 1999), que pode ser convertida em isoxanthohumol, em decorrência de reações de isomerização em consequência do tratamento térmico aplicado durante o processo de fervura empregado na fabricação da cerveja (STEVENS et al., 1998, 1999). Outras chalconas ocorrem em menor proporção, como xanthogalenol, mas também sofre isomerização formando sua flavanona correspondente (STEVENS et al., 2000).

Nesse trabalho, os flavonoides encontrados foram Caempferol-3-*O*-rutinosídeo, Quercetina-3-*O*-rutinosídeo (Rutina), Caempferol-3-*O*-robinosídeo-7-raminosídeo, que coincidem com os descritos na literatura.

Em um estudo fitoquímico realizado anteriormente (PROESTOS, 2006) foi encontrado um teor de fenólicos de 2,9 ± 0.1 mg EAG/g de amostra nas folhas de *Humulus lupulus*. Valores inferiores aos encontrados no presente estudo.

Tem sido demonstrado que as diferentes cultivares, ambientes, parâmetros agro-técnicos podem afetar o acúmulo de compostos fenólicos em plantas de lúpulo (CEHˇ et al., 2007), o que explica a diferença de resultado encontrada.

No mesmo estudo, não foi detectado teores de flavonoides utilizando a rutina como padrão.

Já no estudo feito por ARSENE (2015), o teor de flavonoides foi realizado utilizando as flores do *Humulus lupulus*, coletados em campos do sul da Romênia. O valor encontrado foi de 26.46 ± 2.03 mg ER/g de amostra, valores superiores que os encontrados nesse estudo, o que pode ser explicado devido ao fato de que os flavonoides encontrados nas folhas podem ser diferentes daqueles presentes nas flores, nos caules ou ramos, raízes ou frutos. O mesmo composto ainda pode ocorrer em diferentes concentrações, dependendo do órgão vegetal que se encontra (SIMÕES et al., 2000).

Nos estudos de ABRAM (2007), onde foi realizada a atividade antioxidante pelo método de redução do radical DPPH das folhas de dois cultivares de *Humulus lupulus*, foi possível verificar uma maior atividade antioxidante (IC_{50} de aproximadamente 0,020 mg/ml) do que as encontradas no presente estudo.

Sabe-se que os compostos responsáveis pela atividade antioxidante dos vegetais, geralmente são provenientes do metabolismo secundário, que é responsável pelas relações ecológicas, adaptação e pelos mecanismos de defesa da planta, e que esses metabólitos podem ser mais produzidos em condições de estresse (SOUZA, 2013). Portanto, esse resultado poderia ser justificado pela diferença da época em que as folhas foram coletadas, tempo de vida da planta, variações climáticas, de solo e diferentes técnicas agrícolas aplicadas. Lembrando que o lúpulo tem uma adaptação difícil ao clima brasileiro, por necessitar de baixas temperaturas e de um tempo de exposição à luz variado

(EBY, 2011), oscilando entre nove e quatorze horas diárias, o que também não ocorre no território brasileiro.

7. CONCLUSÃO

Com base no estudo fitoquímico, foi detectada a presença de compostos fenólicos e flavonoides, sendo identificado flavonoides característicos: Caempferol-3-*O*-rutinosídeo, Quercetina-3-*O*-rutinosídeo (Rutina) e Caempferol-3-*O*-robinosídeo-7-raminosídeo. Nesse sentido, a quantificação desses compostos e a análise de sua capacidade antioxidante, trouxe informações acerca das possíveis atividades das folhas de *Humulus lupulus,* em valores considerados satisfatórios, levando em conta que a planta em questão possui difícil adaptação em território brasileiro. Portanto, pode-se concluir que as folhas de lúpulo produzidas no Brasil possuem teores significativos de compostos fenólicos e flavonoides, podendo ser utilizada também par a obtenção de moléculas biologicamente ativas; isso pode agregar valor às folhas do *Humulus lupulus,* uma vez que grande parte dela é descartada após a colheita dos cones do lúpulo.

8. REFERÊNCIAS

ALVES C. Q., BRANDÃO H. N., DAVID J. M., DAVID J. P., LIMA LS. **Avaliação da atividade antioxidante de flavonóides**. Diálogos e ciência – Revista da rede ensino FTC, 2007. v. 5(12), p. 7- 8.

ANDERSEN O. M.; MARKHAM, K. R. **Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications.** Flórida. Taylor & Francis, 2006.

ARSENE L., RODINO S., BUTU A., PETRACHE P., IORDACHE O., BUTU M. **Study on antimicrobial and antioxidant activity and phenolic content of ethanolic extract of *Humulus lupulus***. Farmacia. 2015. v. 63(6), p. 851-85.

BERG, J. M. T. E LUBERT, J. **Bioquímica.** 6.Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 545.

BLUMENTHAL, M. **The Complete German Commission E Monograph: Therapeutic Guide to Herbal Medicines.** American Botanical Council, Austin, TX, 1998. p. 147.

BONOLI, M.; VERARDO, V.; MARCONI, E.; CABONI, M. F. **Antioxidant phenols in barley (*Hordeum vulgare* L.) flour: comparative spectrophotometric study among extraction methods of free and bound phenolic compounds**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Washington, 2004. v. 52, n. 16, p. 5195-5200.

CALIXTO, J. B. **Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents)**. Ribeirão Preto: Braz. J. Med. Biol, 2000. Res., v. 33, n. 2, p.179- 189.

CEH, B., KAˇC, M., KOˇSIR, I. J., ABRAM, V. **Relationships between xanthohumol andpolyphenol content in hop leaves and hop cones with regard to water supplyand cultivar**. International Journaul of Molecular Sciences. 2007. v. 8, p. 989-1000.

CHANG C-C, YANG M-H, WEN H-M AND CHERN J-C. **Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods**. Journal of and Food Drug Analysis. 2002. v. 10, p. 178-182.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATTO, P. S. **Introdução a Métodos Cromatográficos.** 4. Ed. Campinas: Editora Unicamp, 1990. p. 279.

DI STASI, Luis c. (org). **Plantas Medicinais: Arte e Ciência um Guia de Estudo Interdisciplinar.** São Paulo: UNESCO, 1996.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. John Wiley & Sons Ltd, 2009.

DUKE, J. A., 1985. **Handbook of Medicinal Herbs**. CRC Press, Boca Raton. EMEA, 2007.

EBY, S. **Hops, *Humulus lupulus* An investigation of agricultural practices and how producers are linked with business networks and consumers**. Ontário: Nuffield Canada, 2011. p. 58.

GARCIA, E. S. **Biodiversidade, biotecnologia e saúde**. Cadernos de Saúde Pública, 1995. v. 11, n. 3, p. 495-500.

GERHAUSER, C. **Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents**. European Journal of Cancer 41. 2005. p. 1941–1954.

GRIEVE, M. **A Modern Herbal. Dover Publications**, Inc., New York. 1971.

HARBORNE, J.B. WILLIAMS, C.A. **Advances in flavonoid research since 1992**. Phytochemistry. 2000. v. 55, p. 481-504.

HAUNOLD, A. **Cytology, sex expression and growth of a tetraploid × diploid cross in hop (*Humulus lupulus* L.).** Crop Sci. 1971. v. 1, p. 868-871.

HEYWOOD, V. H. **Flowering plants of the world**. Prentice Hall, Inc, Englewood Cliffs, New Jersey. 1985.

JEZEK, J., KRIVÁNEK, J.,POKORNÝ, J. (2013). **Trials with growing hops on low trellis in the czech republic in 2009-2011**. Acta Horticulturae 1010, p. 199-203.

KAUFMAN, P. B.; CSEKE, L. J.; WARBER, S.; DUKE, J. A.; BRIELMANN, H. L. **Natural products from plants**. Boca Raton: CRC Press, FL, 1999.

MABRY, T.J., MARKHAM, K.R., THOMAS, M.B. **The Systematic Identification of Flavonoids.** Springer-Verlag, New York. 1970.

MOLYNEUX, P. **The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity**. Songklanakarin Journal Sciences Technology. 1983. v. 26, p. 545-548.

NACZK M, SHAHIDI F. **Extraction and analysis of phenolics in food**. J Chromatogr A 2004; 1054 (1/2), p.95-111.

NASCIMENTO, J. E.; LACERDA, E. U.; NASCIMENTO, V. T.; MELO, J. G.; ALVES, B. S.; SILVA, L. G. M.; RAMOS, M. A.; LIMA, C. S. A.; ALBUQUERQUE, U. P.; AMORIM, E. L. C. **Produtos à base de Plantas Medicinais Comercializados em Pernambuco - Nordeste do Brasil**. Acta Farmacéutica Bonaerense, 2005. v. 24, n. 1, p. 113-122.

PEDERNEIRAS, L. C. **Urticales das restingas do estado do Rio de Janeiro: flora e padrões de distribuição geográfica.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2009. p. 166.

PENG, Y., Liu F., Ye J. et al. **Quantitative and qualitative analysis of flavonoid markers in Frucus aurantii of different geographical origin by capillary electrophoresis with electrochemical detection**. Journal of Chromatography B. 2005. v. 830, p. 224.

PEREIRA, C. A. M., **Estudo cromatográfico (HPLC, HPTLC, LC-MS) e análise microscópica das folhas de espécies de *Passiflora* L.** 2002. 273f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.

PIMENTEL C. V. M. B.; FRANCKI V. M.; GOLLÜCKE A. P. B. **Alimentos funcionais: introdução às principais substâncias bioativas em alimentos.** São Paulo: Varela; 2005.

PROESTOS, C.; BOZIARISB I.S.; NYCHASB G.J.E., KOMAITISET M. **Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity**. Food Chemistry, Barking, 2006. v.95, p.664-671.

RUFINO M. S. M, ALVES R.E., BRITO E. S., MORAIS S. M., SAMPAIO, C .G., JIMENEZ J. P., CALIXTO F. D. S.. **Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH**. Comunicado Técnico Embrapa, 2007. v.127, p.1-4.

SÄGESSER M.; DEINZER M**. HPLC-Ion Spray-Tandem Mass Spectrometry of Flavonol Glycosides in Hops.** Journal of the American Society of Brewing Chemists, 1996. v.54:3, p. 129-134.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Phenolics in foods and nutraceuticals**. Boca Raton: CRC Press, 2003. p. 576.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R., **Farmacognosia: da Planta ao medicamento**, Porto Alegre/Florianópolis Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2000.

SOUZA, W. **Avaliação da atividade antioxidante e compostos fenólicos de extratos vegetais**. 2013. 37p. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Tecnologia em Alimentos), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campos Mourão, 2013.

STEVENS, J.F.; TAYLOR, A.W.; CLAWSON, J.E.; AND DEINZER, M.L., **Fate of xanthohumol and related prenylflavonoids from hops to beer**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999. v.47(6), p. 2421-2428.

TIWARI, P.; Kumar, B.; Kaur, M.; Kaur, G.; Kaur, H. **Phytochemical screening and Extraction: A Review**. Internationale Pharmaceutica Sciencia, 2011. v.1, n. 1, p. 98-106.

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

VIEGAS Júnior, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. **Os produtos naturais e a química medicinal moderna.** Química Nova, 2006. v. 29, n. 2, p. 326-337.

WAGNER H.; BLADT. S. **Plant Drug Analyses**. Springer, 2ªed. Berlim, 1996. p. 384.

ZANOLI, P.; ZAVATTI, M. **Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. Journal Of Ethnopharmacology**, Elsevier BV**.** 2008. p. 383-396.

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP
Escola de Farmácia

ATESTADO DE CORREÇÃO

Atesto que **Vanessa Aparecida dos Santos,** matrícula 12.1.2270 realizou todas as correções exigidas pela Banca examinadora no manuscrito do Trabalho de Conclusão de Curso: Estudo Fitoquímico e Atividade Antioxidante de Extratos e frações das folhas de *Humulus lupulus* L. (Cannabaceae), podendo o mesmo ser liberado para ser publicado na plataforma do SISBIN-UFOP.

Ouro Preto, 06 de julho de 2018.

Profa. MSc. Regislainy Gomes da Silva
Orientadora - DEFAR-EF-UFOP

Rua Costa Sena, 171 - Centro – CEP: 35400-000 – OURO PRETO – MG- BRASIL
Home page: http://www.ef.ufop.br - E-mail: diretoria@ef.ufop.br - telefax: 0xx (31) 3559-1628