



CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E REDUTORA, E TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS NO EXTRATO SECO DE LÚPULO (HUMULUS LUPULUS LINNAEUS)

Palavras-Chave: ANTIOXIDANTE, LÚPULO, POLIFENÓIS

Autor:

CAROLINA OLIVEIRA CAVALHEIRO, LANUM - DECAN - FEA, UNICAMP

Ms. MARIANA DA ROCHA ALVES (coautor), LANUM – DECAN – FEA, UNICAMP

Prof. Dr. MÁRIO ROBERTO MARÓSTICA JÚNIOR(orientador), LANUM – DECAN – FEA, UNICAMP

INTRODUÇÃO:

O lúpulo (*Humulus lupulus* Linnaeus) é uma espécie vegetal que pertence à ordem Rosales e a família Cannabaceae (DURELLO, SILVA e BOGUSZ, 2019). A palavra *lupulus*, originada do latim *lúpus*, significa um lobo subindo em uma ovelha, é uma referência por ser uma planta trepadeira, que sobe utilizando outras plantas como apoio (SILVA, 2019; ZANOLI e ZAVATTI, 2008).

Recentemente, pesquisadores têm provado a atividade biológica do lúpulo e os mecanismos moleculares que realizam suas atividades (DE OLIVEIRA, DE SOUZA e MAGALHÃUES-GUEDES, 2022). As substâncias que geram grande parte das atividades biológicas do lúpulo, são sintetizadas pelo metabolismo secundário da planta, que constitui diversos componentes (BARBOSA e MOMESSO, s.d.), dentre os quais estão os compostos fenólicos, que integram a classe dos fitoterápicos alimentares (ELROD et al., 2019).

O estresse oxidativo é um aumento nos radicais livres celulares e diminuição da concentração de antioxidante. É o principal causador de danos celulares e é associado a numerosos distúrbios, como o câncer, distúrbios hepáticos e neurológicos e doenças cardiovasculares (ZUGRAVU et al, 2022).

Os antioxidantes são substâncias que atrasam ou impedem a oxidação do substrato, mesmo encontrando-se em baixas concentrações. E são baseados no conceito da capacidade antioxidante total, ou seja, essa capacidade é medida na quantidade de radicais livres extintos pela solução teste de uma amostra biológica (NEHA et al, 2019).

O uso de compostos naturais com ação antioxidante, como plantas com compostos fenólicos, pode contribuir para a defesa do corpo humano contra o estresse oxidativo e efeitos adversos. Os compostos fenólicos, usualmente, induzem enzimas antioxidantes, que quebram os ânions superóxidos e hidroperóxidos (ROTHER et al, 2023). Dentro do grupo dos compostos fenólicos estão os flavonoides que são pigmentos naturais na maioria das plantas, não sintetizada pelo corpo humano, com grande

importância devido a sua atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e antioxidante (DOBRZYNSKA, NAPIERALA e FLOREK, 2020).

O método utilizado para determinação da capacidade antioxidante in vitro foi realizado por FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) e a medição da capacidade redutora pelo método Folin-Ciocalteu. Assim como, a medição do teor de flavonoides totais.

METODOLOGIA:

O extrato de lúpulo seco foi obtido por extração com dióxido de carbono supercrítico, sob condições de pressão e temperatura controladas. Posteriormente, o extrato de lúpulo foi diluído em etanol absoluto na proporção de 1:10 de amostra:solvente, seguido por um processo de filtração simples.

Poder Antioxidante de Redução do Ferro (FRAP)

O método FRAP é baseado na redução do complexo férrico-tripiridiltriazina [$Fe^{III}(TPZ)]^{3+}$ ao complexo ferroso [$Fe^{II}(TPZ)]^{2+}$ em condições ácidas. A mudança de cor de uma solução incolor para a cor azul é causada sob condições ácidas para manter a solubilidade do ferro, realizando a leitura de absorbância em 595 nm de comprimento de onda (SIDDEEG et al, 2021).

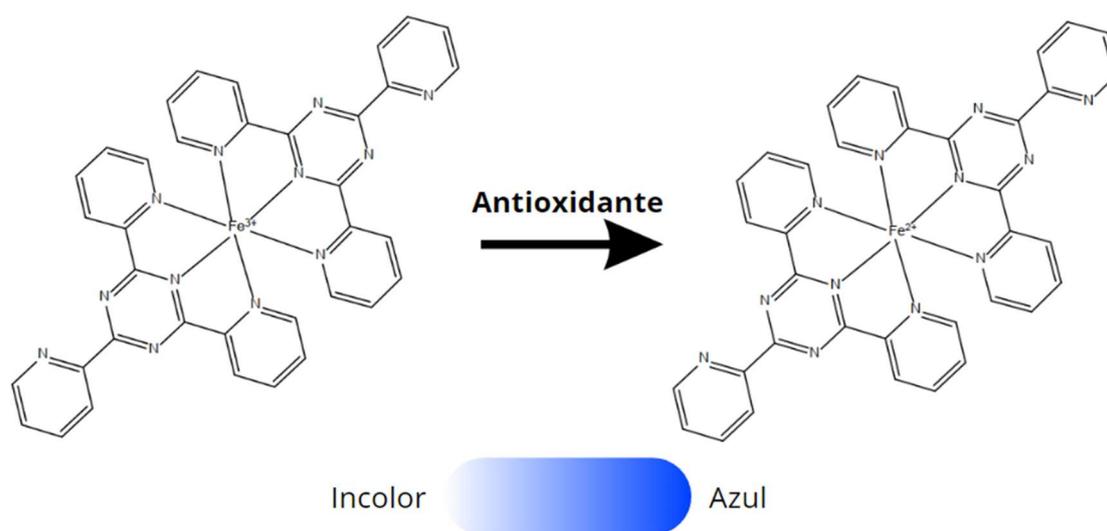


Figura 1 Mecanismo de reação FRAP

Foram preparadas as seguintes soluções:

- Solução de HCl 40 mM: adição de 3,34 mL de HCl concentrado em um balão volumétrico de 1 litro e completado com água destilada;
- Solução de TPTZ 10 mM: dissolver 3,12 g de TPTZ em 5 mL de HCl 40 mM em um balão volumétrico de 1 litro e completar com HCl 40 mM;
- Solução de cloreto férrico 20 mM: dissolver 5,4 g de cloreto férrico com água destilada e completar no balão volumétrico de 1 litro com água destilada;

- Tampão de acetato 0,3 M e pH 3,6: adição de 3,1 g de acetato de sódio em 16 mL de ácido acético glacial e completar o volume de 1 litro em balão volumétrico com água destilada.

O reagente FRAP foi feito no momento da análise, misturando de 25 mL do tampão de acetato 0,3 M, 2,5 mL da solução de cloreto férrico 20 mM e 2,5 mL da solução de TPTZ 10 mM. O reagente FRAP foi usado como branco para obter a curva de calibração ($Y=0,00294x-0,0353$; $R^2=0,997$)

Foi transferida uma alíquota de 20 μ L da amostra do extrato e adicionado 60 μ L de água milli-Q e 600 μ L do reagente FRAP, sendo homogeneizados em Vortex e mantido a 37°C em banho-maria por 30 minutos. Em seguida, a leitura de absorbância foi realizada em $\lambda=595$ nm de comprimento de onda, sendo cada amostra analisada em triplicata. O resultado obtido será expresso em μ mol de Trolox equivalente por grama de peso.

Capacidade Redutora Total (Folin-Ciocalteu)

O método Folin-Ciocalteu é baseado no mecanismo SET (transferência de um elétron), o reagente é uma mistura de fosfomolibdato e fosfotungstato usado para colorimetria in vitro, que tem finalidade de medir a capacidade redutora total. A cor azul é gerada quando o Folin-Ciocalteu reage com fenóis e absorve o comprimento de onda de 725 nm, causada pela redução de Mo^{6+} em Mo^{5+} . Os derivados aniônicos dos ácidos fosfotungstico e fosfomolibdico alteram a cor de amarelo para azul (CHRISTODOULOU et al, 2022; BIBI SADEER et al, 2020).

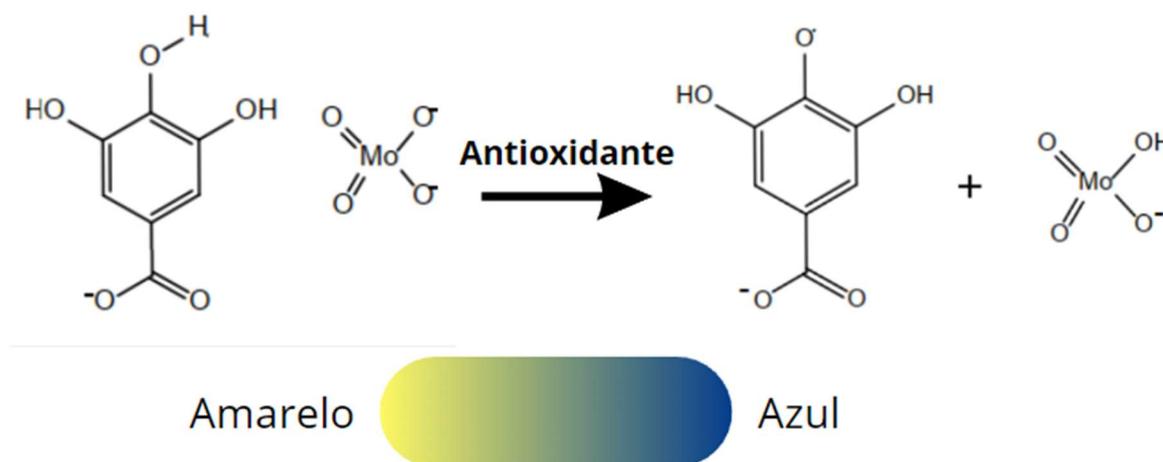


Figura 2 Mecanismo de reação Folin-Ciocalteu

Preparação dos reagentes:

- Solução saturada de carbonato de sódio 10%: pesar 10,599 g de carbonato de sódio e dissolver em 100 mL de água destilada;
- Solução padrão de ácido gálico: dissolução de 10 mg de ácido gálico em 10 mL de água;
- Solução de Folin-Ciocalteu.

A curva padrão foi preparada, incluindo quatro pontos, sendo um o ponto de concentração zero. A leitura das absorbâncias foi feita em espectrofotômetro a 725 nm de comprimento de onda,

relacionando a concentração padrão e os valores de absorbância, foi construída uma curva de regressão linear, sendo $Y=0,00291x-0,0354$ e $R^2=1$.

Para os ensaios das amostras foram utilizados 50 μL da amostra do extrato, 800 μL de água e 50 μL de Folin-Ciocalteu, homogeneizar e repousar durante três minutos no escuro. Em seguida, adiciona-se 50 μL de carbonato de sódio e deixa-se em repouso por duas horas, ao abrigo da luz. Após homogeneizado, foi pipetado 250 μL para realização da leitura em modo triplicata. Os resultados da capacidade redutora total serão expressos em equivalente de ácido gálico de mg de peso seco.

Flavonoides Totais

Reagentes utilizados:

- Catequina 0,002g/ 10ml de água
- Nitrito de sódio (NaNO_2) 5% m/v
- Cloreto de Alumínio (AlCl_3) 10% m/v
- Hidróxido de sódio (NaOH) 1M (1mol/L)

A determinação de flavonoides totais foi realizada em absorbância de 510 nm, a partir do complexo formado entre o flavonoide e o alumínio do reagente de cor, formando compostos de coloração amarela. O teor de flavonoides totais foi calculado a partir da equação da curva de calibração obtida por regressão linear, sendo $Y = 0,0047x + 0,0037$ e $R^2 = 0,9993$. Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de catequina por grama.

RESULTADOS:

A partir dos resultados obtidos pelas análises do extrato seco de lúpulo, foi possível estimar a capacidade redutora total, a determinação do teor de flavonoides totais e consequentemente seu potencial antioxidante. A capacidade redutora total foi determinada pelo método Folin-Ciocalteu e expresso como miligrama de equivalentes de ácido gálico por grama de peso seco, já para o conteúdo de flavonoides totais foi calculado como miligramas de equivalentes de catequina por grama, enquanto o potencial antioxidante pelo método FRAP foi expresso em μmol de Trolox equivalente por grama. A capacidade redutora total foi de $24,46 \pm 1,52$ mg EAG/g, o teor de flavonoides totais foi de $2,61 \pm 0,15$ mg ECAT/g e o resultado do FRAP foi $73,63 \pm 2,10$ μmol Trolox equivalente/g.

CONCLUSÕES:

A partir dos resultados obtidos concluiu-se que o extrato seco de lúpulo possui capacidade antioxidante e redutora, visto que os resultados revelaram similaridade com a literatura, sendo um alimento com alto teor de flavonoides. Assim, o extrato vegetal poderia representar uma fonte natural e segura na aplicação industrial e de saúde.

BIBLIOGRAFIA

- BARBOSA, Saulo; MOMESSO, Luciano da Silva. **Humulus lupulus L.: Descrição botânica, química e atividades**. Centro Universitário das Faculdades Integradas de Ourinhos. [s.d.].
- BIBI SADEER, Nabeelah et al. The versatility of antioxidant assays in food science and safety—Chemistry, applications, strengths, and limitations. **Antioxidants**, v. 9, n. 8, p. 709, 2020.
- CHRISTODOULOU, Marios C. et al. Spectrophotometric methods for measurement of antioxidant activity in food and pharmaceuticals. **Antioxidants**, v. 11, n. 11, p. 2213, 2022.
- DE OLIVEIRA, Clécio Rodrigues; DE SOUZA, Carolina Oliveira; MAGALHÃES-GUEDES, Karina Teixeira. **Compostos antioxidante presentes na cerveja e sua relação com a saúde humana**. Editora Científica Digital, Vol 1, 2022.
- DOBRZYNSKA, Malgorzata; NAPIERALA, Marta; FLOREK, Ewa. Flavonoid nanoparticles: A promising approach for cancer therapy. **Biomolecules**, v. 10, n. 9, p. 1268, 2020.
- DURELLO, Renato S.; SILVA, Lucas M.; BOGUSZ, Stanislaw. **Química do lúpulo**. Química Nova, v. 42, p. 900-919, 2019.
- SILVA, C. T. D. **Caracterizações químicas dos primeiros cultivares de lúpulo (Humulus lupulus L.) produzidos no Brasil**. 2019.
- ELROD, Susan M. et al. Relationship between phenolic and antioxidant concentration of Humulus lupulus and alpha acid content. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 77, n. 2, p. 134-139, 2019.
- NEHA, Kumari et al. Medicinal prospects of antioxidants: A review. **European journal of medicinal chemistry**, v. 178, p. 687-704, 2019.
- ROTHE, Julia et al. Analytical determination of antioxidant capacity of hop-derived compounds in beer using specific rapid assays (ORAC, FRAP) and ESR-spectroscopy. **European Food Research and Technology**, v. 249, n. 1, p. 81-93, 2023.
- SIDDEEG, Azhari et al. Mode of action and determination of antioxidant activity in the dietary sources: An overview. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 3, p. 1633-1644, 2021.
- ZANOLI, Paola; ZAVATTI, Manuela. Pharmacognostic and pharmacological profile of Humulus lupulus L. **Journal of ethnopharmacology**, v. 116, n. 3, p. 383-396, 2008.
- ZUGRAVU, Corina-Aurelia et al. **Antioxidants in Hops: Bioavailability, Health Effects and perspectives for New Products**. Antioxidants, v. 11, n. 2, p. 241, 2022.