



Mestrado de Ciências Aplicadas da Saúde 2019/2020

Silena Silva Delgado Alves

Humulus lupulus L.: aplicação cosmética de extratos obtidos de
cones e partes vegetativas

Dissertação apresentada à Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico de
Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Aplicadas da Saúde - Ramo
Biotecnologia

Orientado por:

Professora Doutora Olívia R. Pereira

Professora Doutora Maria João Sousa

Esta dissertação não inclui as críticas e sugestões feitas pelo Júri.

Bragança, novembro, 2020

Humulus lupulus L.: aplicação cosmética de extratos obtidos de cones e partes vegetativas

Silena Silva Delgado Alves

Dissertação apresentada ao Instituto Politécnico de Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Aplicadas da Saúde - Ramo Biotecnologia

Orientado por:

Professora Doutora Olívia R. Pereira

Professora Doutora Maria João Sousa

Bragança, 2020

Este trabalho foi elaborado com vista a obtenção do grau de Mestre em Ciências Aplicadas da Saúde - Ramo Biotecnologia, de acordo com o Decreto-Lei N.º 4852/2019 de 14 maio, sob orientação da Professora Doutora Olívia R. Pereira e Professora Doutora Maria João Sousa.

Agradecimentos

É com enorme satisfação que agradeço a todos que de uma forma direta ou indireta, colaboraram e contribuíram para a realização desta dissertação.

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por te me dado força para seguir e superar todas as dificuldades.

Aos meus pais e meus irmãos, que sempre me apoiaram, em especial a minha mãe e a minha irmã que se fartaram de ouvir as minhas queixas durante todo este percurso. Ao meu pai que sempre se dedicou na educação e formação dos seus filhos. Ao meu avô, Benvindo Pinto que na sua simplicidade e sem se aperceber, me transmitiu valores como determinação, perseverança e autoexigência.

Um especial agradecimento também à minha orientadora, professora Olívia Pereira, da Escola Superior de Saúde, e à minha coorientadora, professora Maria João Sousa, da Escola Superior de Agrária, primeiramente por terem aceitado este cargo de me orientarem neste trabalho, pelo apoio, disponibilidade e ajuda, que sempre demonstraram ao longo da realização do trabalho laboratorial e escrito.

À professora Andrea Afonso, deixo o meu muito obrigado, pela dedicação e disponibilidade oferecido durante os trabalhos laboratoriais relativos aos testes antimicrobianos.

A minha grande amiga Diana Francisco Cuma, pelo grande suporte durante todo este percurso.

A minha querida Helicia, por todo o suporte.

A todos os meus amigos que me apoiaram durante esta etapa.

A Carmem Natalia de Pina Gonçalves por todo o apoio.

A Escola Superior de Agrária pela disponibilidade de espaço e condições para que os testes laboratoriais fossem feitos.

O meu sincero obrigada a todos, muito obrigada.

Resumo

Introdução: Atualmente tem-se verificado um interesse cada vez maior na procura de compostos bioativos provenientes de plantas aromáticas e medicinais, com potencial de aplicação nas áreas alimentar, farmacêutica e cosmética.

O lúpulo (*Humulus lupulus L.*) é mundialmente conhecido como matéria prima essencial na indústria cervejeira, no entanto, estudos recentes têm revelado vários benefícios, com especial ênfase para as atividades antibacteriana, antifúngica e antioxidante, com potencial de aplicação na saúde.

No processo da produção da cerveja, são utilizados os cones da planta, sendo que a parte vegetativa é descartada, embora a literatura indique que esta possui compostos igualmente interessantes. Ainda, o perfil fitoquímico e as propriedades biológicas e farmacológicas da parte vegetativa permanecem pouco estudadas.

Objetivos: Este trabalho teve como principal objetivo desenvolver uma formulação em gel, incorporando extratos hidroalcoólicos de cones e partes vegetativas das variedades Nugget e Polaris de *Humulus lupulus L.* e de lúpulo espontâneo, e subsequentemente avaliar o gel em termos de estabilidade. Além disso, pretendeu-se determinar o perfil fitoquímico dos extratos hidroalcoólicos de lúpulo, assim como avaliar a capacidade antibacteriana e antifúngica destes extratos e também do óleo essencial de *Thymus zygis* subsp. *zygis*.

Materiais e Métodos: Procedeu-se assim, por LC-MS/MS, ao estudo fitoquímico dos extratos hidroalcoólicos previamente obtidos a partir de cones e partes vegetativas das duas variedades de lúpulo, Nugget e Polaris, e de lúpulo espontâneo.

Também se fez a extração do óleo essencial de *Thymus zygis* subsp. *zygis* por hidrodestilação, com recurso a um Clevenger, e a avaliação da sua capacidade de inibição do crescimento bacteriano e fúngico, propriedade igualmente avaliada para os extratos de lúpulo, através do método de microdiluição em caldo e método de difusão em agar, respetivamente.

Adicionalmente, a estabilidade das formulações em gel preparadas com diferentes concentrações dos extratos de lúpulo, (1,25%, 2,5% e 5%) foram avaliadas através de uma série de ensaios físico-químicos de que são exemplo a determinação do pH, densidade, avaliação da textura, vibração mecânica, teste espectrofotométrico, centrifugação, humidade relativa, teste de luz, variação extrema de temperatura consecutiva e avaliação das características organolépticas (odor, cor e aspetos gerais).

Resultados: Os testes de estabilidade não revelaram separação de fases ou liquidificação das amostras de gel preparadas. Em relação ao teste de vibração, não ocorreram alterações nas formulações, o que indica que as mesmas poderão ser transportadas por transporte terrestre sem ocorrerem modificações. Não se registaram alterações nas características organolépticas das formulações, no teste de humidade relativa nem no teste de variação extrema da temperatura. As formulações apresentaram um pH ácido, entre $5,93 \pm 0,047$ e $6,16 \pm 0,047$ e uma densidade aparente entre $1,08 \pm 0,00 \text{ Kg/m}^{-3}$ e $1,14 \pm 0,03 \text{ Kg/m}^{-3}$. No teste espectrofotómetro as formulações contendo concentrações maiores de extrato obtiveram valores maiores de absorvância. Embora a firmeza das formulações não tenha aumentado com o aumento das concentrações dos extratos, a consistência diminuiu com o aumento das concentrações dos extratos,

O óleo essencial de *Thymus zygis* subsp. *zygis* apresentou atividade antibacteriana e antifúngica contra todas as estirpes de bactérias e fungos testadas, apresentando maior atividade antibacteriana contra *S. aureus* com um MIC igual a 0,031%, e menor atividade antibacteriana contra a *P. aeruginosa* com um MIC igual a 1,25%. Relativamente aos extratos hidroalcoólicos do lúpulo, estes não apresentaram atividade antibacteriana e antifúngica contra as estirpes de bactérias e fungos, nas concentrações utilizadas.

O estudo e comparação do perfil fenólico dos extratos de cones e partes vegetativas, das variedades Nugget e Polaris de lúpulo e de lúpulo espontâneo, permitiu identificar trinta compostos, dos quais ácidos alfa e beta, ácidos fenólicos e flavonóides.

Conclusão: Pode concluir-se com este trabalho, que a incorporação de extratos hidroalcoólicos de lúpulo em formulações de gel com polímero de Carbopol, não altera a maior parte das propriedades físico-químicas avaliadas. O óleo essencial de *Thymus zygis* subsp. *zygis* pode ser utilizado como conservante das formulações uma vez que possui

Humulus lupulus L.: aplicação cosmética de extratos obtidos de cones e partes vegetativas

propriedades antibacterianas e antifúngicas. As partes vegetativas, assim como os cones das variedades Nugget e Polaris de lúpulo e de lúpulo espontâneo, possuem compostos importantes do ponto de vista cosmético.

Palavras-chave: *Humulus lupulus L.*, lúpulo, cosméticos naturais, bioatividade, *Thymus zygis* subsp. *zygis*, compostos fenólicos, extratos hidroalcoólicos, óleo essencial.

Abstract

Introduction: Nowadays there is an increasing interest in the search for bioactive compounds obtained from aromatic and medicinal plants, with potential application in the food, pharmaceutical and cosmetic areas.

Hops (*Humulus lupulus L.*) is known worldwide as an essential raw material for the beer industry, however, recent studies have revealed benefits, with special emphasis on antibacterial, antifungal and antioxidant activities, with potential applications in health.

In the beer production process, the cones of the plant are used, and the vegetative part is discarded, although the literature indicates that it had also interesting compounds. Still, the phytochemical profile and the biological and pharmacological properties of the vegetative part of hops remain poorly studied.

Objectives: This work as main objective to develop a gel formulation, incorporating hydroalcoholic extracts of cones and vegetative parts of the varieties Nugget and Polaris of *Humulus lupulus L.* and spontaneous hops, and subsequently to evaluate the stability of the gel. Furthermore, it was intended to determine the phytochemical profile of the hydroalcoholic extracts of hops, as well as to evaluate the antibacterial and antifungal capacity of these extracts and also of the essential oil of *Thymus zygis* subsp. *Zygis*.

Materials and Methods: LC-MS/MS was used for phytochemical study of hydroalcoholic extracts previously obtained from cones and vegetative parts of the two varieties of hops, Nuggets and Polaris, and spontaneous hops.

The essential oil of *Thymus zygis* subsp. *Zygis* was obtained by Clevenger apparatus and their antimicrobial properties evaluated. This activity was also determined for hops extracts.

Additionally, the stability of gel formulations prepared with different levels of hops extracts (1.25%, 2.5% and 5%) were evaluated through a series of physical-chemical tests such as the pH, density, texture evaluation, mechanical vibration,

spectrophotometric test, centrifugation, relative humidity, light test, consecutive extreme temperature variation and evaluation of organoleptic characteristics.

Results: The stability tests did not reveal phase separation or liquefaction of the prepared gel sample. Regarding the vibration test, there were no changes in the formulations, which indicates that they can be transported by ground transport without changes. There was no change in the organoleptic characteristics of the formulations, and the relative humidity test also revealed no changes in the formulations as well as in the extreme temperature variation test. The formulations showed an acid pH, between $5,93 \pm 0,047$ and $6,16 \pm 0,047$. The apparent density of the formulations test, showed an apparent density of formulations between $1,08 \pm 0,00 \text{ Kg/m}^{-3}$ and $1,12 \pm 0,00 \text{ Kg/m}^{-3}$. In the spectrophotometer test, formulations containing higher concentrations of extract obtained higher absorbance values. While firmness of the formulations did not increase with the increase of the concentrations of the extracts, the consistency of the formulations decreased with the increase of the concentrations of the extracts.

The essential oil of *Thymus zygis* subsp. *zygis* showed antibacterial and antifungal activity against all strains of bacteria and fungi tested, showing greater antibacterial activity against *S. aureus* with a MIC equal to 0,031%, and less antibacterial activity against *P. aeruginosa* with a MIC equal to 1,25%. Regarding the hydroalcoholic extracts of the hops, they did not show antibacterial and antifungal activity against strains of bacteria and fungi, in the concentrations used.

The study of the phenolic profile of cones and vegetative parts, of the Nugget and Polaris varieties of hops and of spontaneous hops, allowed the identification of thirty compounds, of which alpha and beta acids, phenolic acids and flavonoids.

Conclusion: It can be concluded with this work, that the incorporation of hydroalcoholic extracts of hops in gel formulations with polymer of Carbopol, does not alter most of the evaluated physicochemical properties. The essential oil of *Thymus zygis* subsp. *zygis* can be use as preservative in the formulations since it has antibacterial and antifungal properties. The vegetative parts, as well as the cones of the Nugget and Polaris varieties of hops and the spontaneous hops, have important compounds from the point of view of cosmetics.

Keywords: *Humulus lupulus* L., hops, natural cosmetics, bioactivity, *Thymus zygis* subsp. *zygis*, phenols, hydroalcoholic extracts, essential oil.

Índice

Resumo	5
Abstract.....	8
Índice de tabelas	14
Índice de figuras	15
Índice de Gráficos.....	16
Abreviaturas.....	17
1.Introdução.....	19
1.1 Cosméticos.....	19
1.1.1 Incorporação de produtos naturais em cosméticos.....	22
1.1.2. Estabilidade dos Produtos cosméticos.....	23
1.2. <i>Humulus lupulus L.</i>	25
1.2.1. Classificação botânica e aspetos morfológicos da planta.....	25
1.2.2. Cultura do lúpulo.....	26
1.2.3. Composição química do lúpulo.....	28
1.2.4. Propriedades Farmacológicas e Biológicas do lúpulo.....	32
1.3. Óleos essenciais	36
1.3.1 Extração de óleos essenciais	37
1.3.2 Óleo essencial de <i>Thymus zygis</i> subsp. <i>zygis</i>	38
1.3.2.1. Composição química do <i>Thymus zygis</i> subsp. <i>zygis</i>	39
1.3.2.2 Atividades biológicas e farmacológicas do óleo essencial de <i>Thymus zygis</i> subsp. <i>zygis</i>	40
2. Problemática	42
3. Objetivos.....	42
4. Materiais e Métodos	43
4.1. Obtenção da Matéria-prima	43
4.2. Reagentes e Materiais	44
4.3. Extração hidroalcoólica de lúpulo	44
4.4. Extração de óleo essencial de <i>Thymus zygis</i> subsp. <i>zygis</i>	45
4.5. Determinação do perfil fenólico	46
4.6. Preparação das formulações em gel.....	47
4.7. Avaliação da Estabilidade dos géis – Testes de estabilidade preliminar	48

4.7.1. Análise organoléptica das formulações.....	48
4.7.2. Determinação do pH.....	48
4.7.3. Avaliação da textura.....	49
4.7.4. Vibração Mecânica.....	50
4.7.5. Teste de Centrifugação.....	50
4.7.5. Teste Espectrofotométrico.....	51
4.7.6. Densidade.....	51
4.8. Avaliação de Estabilidade dos géis – Teste de Estabilidade Acelerada.....	52
4.8.1. Teste de Humidade Relativa.....	52
4.8.2. Teste de Luz.....	53
4.8.3. Variação extrema da temperatura consecutiva.....	53
4.9. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica.....	54
4.9.1 Atividade antibacteriana – Método de microdiluição em caldo.....	55
4.9.2. Atividade antifúngica – Método de difusão em agar.....	57
5. Resultados e Discussão.....	58
5.1 Extratos e perfil fenólico.....	58
5.1. Avaliação da estabilidade da formulação em gel – Teste de estabilidade preliminar.....	65
5.1.1. Análise organoléptica.....	65
5.1.2. Medição do pH.....	67
5.1.3. Textura (firmeza, consistência, coesividade e o índice de viscosidade).....	68
5.1.4. Vibração Mecânica.....	72
5.1.5. Teste de Centrifugação.....	73
5.1.6. Teste Espectrofotométrico.....	74
5.1.7. Densidade.....	78
5.2. Avaliação da estabilidade da formulação em gel – Teste de estabilidade acelerada.....	79
5.2.1. Teste de Humidade relativa.....	79
5.2.2. Teste de Luz.....	80
5.2.3. Variação extrema da temperatura consecutiva.....	81
5.3. Atividade antimicrobiana e antifúngica.....	81
5.3.1. Atividade antibacteriana.....	82
5.3.2. Atividade antifúngica.....	84

6. Conclusão	87
7. Referências Bibliográficas.....	90
8. Anexos	99

Índice de tabelas

Tabela I - Composição geral de cones do lúpulo seco. Adaptado de: Zanolli & Zavatti, 2008.	28
Tabela II - Principais compostos do óleo essencial obtido a partir das partes aéreas de <i>Thymus zygis</i> subsp. <i>zygis</i> (Adaptado de: Dandlen et al., 2011).....	40
Tabela III - Composição da formulação em gel.....	47
Tabela IV - Composição do meio de leveduras	55
Tabela V – Composição do meio de Bactérias	55
Tabela VI - Rendimento dos extratos hidroalcoólicos do lúpulo.	58
Tabela VII – Composição fitoquímica de extratos hidroalcoólicos do lúpulo determinados por UHPLC-DAD-ESI-MS ⁿ	61
Tabela VIII – Análise organoléptica dos géis 0, 7, 14 e 30 dias após preparação.....	65
Tabela IX – Resultados da densidade obtidos após a preparação das formulações, 3 e 7 dias depois.	78
Tabela X – Atividade antibacteriana (MIC e MBC) dos extratos do lúpulo e do óleo essencial do <i>Thymus zygis</i> subsp. <i>Zygis</i>	82
Tabela XI – Resultado da atividade antifúngica do óleo essencial de <i>Thymus zygis</i> subsp. <i>zygis</i> para a <i>Candida albicans</i>	85
Tabela XII – Resultado da determinação do pH das formulações, após preparação (0), 3, 7 e 14 dias depois.	99
Tabela XIII – Resultado do pH das formulações no final do teste de humidade relativa e após 8 dias.....	100

Índice de figuras

Figura 1 - A) Campos de lúpulo; B) Cones de lúpulo; C) Glândulas de lupulina; Adaptado: (Sousa, 2005).	26
Figura 2 - Composição química dos cones do lúpulo.	28
Figura 3 - Estruturas químicas dos ácidos amargos do lúpulo (Zanoli & Zavatti, 2008).	30
Figura 4 – <i>Thymus zygis</i> subsp. <i>zygis</i> da zona de Rebordãos, Bragança, Portugal.....	39
Figura 5 – Extratos hidroalcoólicos obtidos a partir de partes vegetativas (a) e cones (b).	45
Figura 6 - Extração de óleo essencial com recurso a um Clevenger.	46
Figura 7 – Formulações em gel dos diferentes extratos da planta de lúpulo.....	48
Figura 8 – Determinação do pH das formulações.	49
Figura 9 – Avaliação da textura.	50
Figura 10 - Teste de Centrifugação.	51
Figura 11 – Determinação da densidade aparente.	52
Figura 12 – Teste de Humidade relativa.....	52
Figura 13 – Amostras expostas a lâmpada de daylight.	53
Figura 14 - Atividade antibacteriana – método de microdiluição.	56
Figura 15 – Atividade antifúngica – método de difusão em disco em agar	57
Figura 16 - Resultado do teste de vibração mecânica.	73
Figura 17 – Resultado do teste de centrifugação.....	74
Figura 18 – Resultado do teste de luz.....	81
Figura 19 - Resultados da atividade antifúngica dos extratos do lúpulo com a <i>Candida albicans</i> . 84	
Figura 20 - Resultado do método de Difusão em disco em placa do óleo essencial de <i>Thymus zygis</i> subsp. <i>zygis</i>	85

Índice de Gráficos

Gráfico I – Representação cromatográfica de cones (linha cinza) e parte vegetativa (linha verde) de lúpulo espontâneo a 280 nm.....	59
Gráfico II - Representação cromatográfica de cones (linha cinza) e parte vegetativa (linha verde) da variedade Polaris de lúpulo a 280 nm.	60
Gráfico III - Representação cromatográfica de cones (linha cinza) e parte vegetativa (linha verde) da variedade Nugget de lúpulo a 280 nm.....	60
Gráfico IV – Firmeza, consistência, coesividade e índice de viscosidade dos géis com diferentes concentrações (1,25%, 2,5% e 5%) de extrato hidroalcoólico de partes vegetativas da variedade Nugget de lúpulo.	68
Gráfico V – Firmeza, consistência, coesividade e índice de viscosidade dos géis com diferentes concentrações (1,25%, 2,5% e 5%) de extrato hidroalcoólico dos cones da variedade Nugget de lúpulo.....	69
Gráfico VI – Firmeza, consistência, coesividade e índice de viscosidade dos géis com diferentes concentrações (1,25%, 2,5% e 5%) de extrato hidroalcoólico de partes vegetativas da variedade Polaris de lúpulo.....	69
Gráfico VII – Firmeza, consistência, coesividade e índice de viscosidade dos géis com diferentes concentrações (1,25%, 2,5% e 5%) de extrato hidroalcoólico dos cones da variedade Polaris de lúpulo.	70
Gráfico VIII – Firmeza, consistência, coesividade e índice de viscosidade dos géis com diferentes concentrações (1,25%, 2,5% e 5%) de extrato hidroalcoólico de partes vegetativas de lúpulo espontâneo.	70
Gráfico IX – Firmeza, consistência, coesividade e índice de viscosidade dos géis com diferentes concentrações (1,25%, 2,5% e 5%) de extrato hidroalcoólico dos cones de lúpulo espontâneo.	71
Gráfico X – Firmeza, consistência, coesividade e índice de viscosidade do gel base..	71
Gráfico XI – Resultados da análise espectrofotométrica do gel base.	75
Gráfico XII – Resultados da análise espectrofotométrica de Nuggets vegetal.	75
Gráfico XIII – Resultados da análise espectrofotométrica de Nuggets flor.	76
Gráfico XIV – Resultados da análise espectrofotométrica de Polaris Flor.	76
Gráfico XV – Resultados da análise espectrofotométrica de Polaris Vegetal.....	77
Gráfico XVI – Resultados da análise espectrofotométrica de lúpulo Espontâneo Vegetal.....	77
Gráfico XVII – Resultado da análise espectrofotométrica de lúpulo Espontâneo Flor. .	78

Abreviaturas

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CaCl₂ – Cloreto de Cálcio

DMSO – Dimetilsulfoxido

E. coli – *Escherichia coli*

FP – Farmacopeia Portuguesa

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

KCl – Cloreto de Potássio

LDL – Lipoproteínas de baixa densidade

LN - *Likens-Nickerson*

LOX - Lipoxigenase

MAE – Extração assistida por micro-ondas

MBC- Concentração mínima bactericida

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

MgSO₄ - Sulfato de Magnésio

MIC - Concentração mínima inibitória

MS – Espectrometria de massas

MS² – Fragmentos iônicos importantes

M-H – Ião pseudomolecular

NaCl – Cloreto de Sódio

NaHCO₃ – Bicarbonato de Sódio

NCTC – National Collection of Thype Cultures

OE - Óleo essencial

PVP – Polivinilpirrolidona

R_t – Tempo de retenção

SD – Destilação a vapor

SDE – Extração por destilação simultânea

SFE – Extração com fluidos supercríticos

Humulus lupulus L.: aplicação cosmética de extratos obtidos de cones e partes vegetativas

S. aureus – *Staphylococcus aureus*

Subsp – Subespécie

UFC – Unidade formadora de colónias

UV – Espectrofotometria Ultravioleta

1.Introdução

1.1 Cosméticos

O termo “cosméticos” deriva do grego “Kosm tikos” que significa “tendo o poder de arranjar, hábil na decoração”, de dar “kosmein”, para enfeitar, e “kosmos”, ordem, harmonia (Halla et al., 2018). Segundo o regulamento do Conselho da União Europeia e o Decreto-Lei n.º 296/98, de 25 de Setembro disponibilizado no Infarmed, um produto cosmético e de higiene corporal define-se como qualquer substância ou mistura destinada a ser posta em contato com as partes externas do corpo humano (epiderme, sistema capilar, unhas, lábios e órgãos genitais externos) ou com os dentes e as mucosas da cavidade oral com a finalidade de, exclusiva ou principalmente, os limpar, perfumar, modificar o seu aspeto e ou proteger ou os manter em bom estado e ou de corrigir os odores corporais (INFARMED, 2020; PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO, 2009).

A pele é o órgão de maior dimensão do organismo humano revestindo quase toda a superfície do corpo, constituindo uma barreira eficaz de defesa e regulação, assegurando as relações entre o meio interior e exterior. É a pele que determina o aspeto ou a aparência, imprime carácter sexual e racial e protege o corpo, pelo facto de se tratar de uma barreira dotada de resistência, semi-permeabilidade e plasticidade (Benedetto, 1998). Para manter a pele saudável e para melhorar a aparência física e prevenir processos naturais que influenciam a aparência exterior do ser humano utilizam-se cosméticos (Chaiyasut *et al.*, 2018).

Os produtos cosméticos podem ser classificados quanto ao uso, campos de aplicação, funções, forma de preparação, idade ou sexo do consumidor, entre outros, sendo que podem ser classificados em (Halla et al., 2018):

- Cosméticos para limpeza pessoal (sabonetes, desodorizantes, champôs);
- Cosméticos para os cuidados da pele e do cabelo (cremes corporais);
- Cosméticos para embelezamento (perfumes);
- Cosméticos de proteção (produtos solares, produtos antirrugas);

- Cosméticos corretivos (máscaras de beleza, tinturas de cabelo);
- Cosméticos de manutenção (creme de barbear, cremes hidratantes);
- Cosméticos ativos (antissépticos).

A administração cutânea de produtos cosméticos é uma via especialmente destinada à obtenção de uma ação tópica, mais ou menos profunda. Os ingredientes utilizados na produção de produtos cosméticos, dependem muito do tipo de formulação pretendida (creme, gel, emulsão, loção, etc.). Ainda assim, as principais matérias primas utilizadas na composição de um produto cosmético são a água, materiais oleosos, como óleos, gordura e cera, surfactantes, umectantes, agentes espessantes, antioxidantes, conservantes, agentes corantes, como corantes e pigmentos, juntamente com vitaminas, extratos de plantas e fragrâncias (Mitsui T, 1997).

As preparações semissólidas apresentam aspeto homogéneo e destinam-se a libertação local das substâncias ativas. São constituídas por um excipiente, simples ou composto, no qual são dissolvidas ou dispersas uma ou várias substâncias ativas. Os excipientes que se utilizam podem ser substâncias de origem natural ou sintética e podem ser monofásicos ou multifásicos. Deste modo, conforme a natureza do excipiente, a preparação pode ter propriedades hidrófilas ou hidrófobas. Por outro lado, a preparação pode conter outros excipientes específicos, como agentes antimicrobianos, antioxidantes, estabilizantes, emulsionantes, espessantes e promotores da absorção. (Farmacopeia Portuguesa VIII, 2005).

Podem distinguir-se vários tipos de preparações semissólidas cutâneas como: pomadas, cremes, géis, pastas, cataplasmas e emplastros medicamentosos. Os cremes as pomadas e os géis apresentam geralmente um comportamento viscoelástico consoante a sua estrutura. Os cremes e os geles constituem os sistemas semissólidos mais utilizados na produção de produtos cosméticos (Farmacopeia Portuguesa VIII, 2005). Os géis são sistemas semissólidos que consistem em dispersões de pequenas ou grandes moléculas num veículo líquido que adquire consistência semelhante a geleias pela adição de um agente gelificante (Ansel et al., 2007). As formulações em gel, apresentam menor grau de toxicidade com possibilidade de aplicação em diversos locais (Lopes et al., 2006).

Quanto à composição, os geles são formados por:

- Agente gelificante;
- Água ou solvente orgânico;
- Umectante: glicerina, propilenoglicol ou sorbitol;
- Substâncias ativas.

Os agentes gelificantes são classificados em função da sua origem e da natureza dos polímeros:

- Polímeros naturais:
 - Origem animal (caseína, gelatina);
 - Origem vegetal: exsudados vegetais (goma arábica, goma adraganta); extratos de sementes (amido e derivados); extratos de algas (alginatos);
 - Origem mineral: silicatos alcalinoterrosos (bentonite); silício anidro (sílica);
- Polímeros sintéticos:
 - Derivados de éteres de celulose: metilcelulose; hidroxietilcelulose; carboximetilcelulose sódica;
- Polímeros vinílicos:
 - Álcoois polivinílicos;
 - Polivinilpirrolidona (PVP);
- Polímeros carboxivinílicos:
 - Carbómeros (Carbopol®).

Os géis na maioria das vezes possuem um aspeto transparente e são de aplicação fácil, o que os torna uma forma cosmética bem aceite pelos consumidores. São bem tolerados, facilmente laváveis e produzem uma sensação de frescura sobre a pele. Empregam-se em numerosas preparações cosméticas, tais como geles anti celulite, máscaras faciais e em produtos antienvhecimento (Nogueira et al., 1995).

De acordo com a natureza do solvente, os geles podem ser:

- Hidrogéis (hidrófilos): designadas de preparações cujo excipiente (base) são habitualmente a água, a glicerina e o propilenoglicol, gelificados com agentes gelificantes apropriados, como o amido, os derivados da celulose, os carbómeros ou os silicatos de magnésio-alumínio;
- Oleogéis: gel lipofílico, cujo excipiente é geralmente constituído por parafina líquida adicionada com compostos polietilenos, ou óleos gordos gelificados pela sílica coloidal ou sabões de alumínio ou de zinco (FP VIII, 2005).

1.1.1 Incorporação de produtos naturais em cosméticos

A estreita ligação Homem-Plantas é já bastante antiga. Desde tempos muito remotos que o homem aprendeu a utilizar as plantas para o seu proveito. Muitos povos ou civilizações foram armazenando um vasto conhecimento acerca de como usar muitas das variedades de plantas. O homem aprendeu a usar e manipular diversas plantas que possuem propriedades curativas, tendo muitas delas desempenhado um papel importante no desenvolvimento da medicina ao longo de vários séculos (Rodrigues, 2007).

A grande diversidade de plantas aromáticas na China e Índia, conduziu à extração de óleos essenciais. O Egipto e posteriormente a Mesopotâmia, destacaram-se no conhecimento e emprego destes óleos e extratos vegetais em preparações como unguentos e bálsamos com finalidades cosméticas (Farnsworth, 2001).

De facto, os conceitos de beleza e cosmética são tão antigos quanto o homem e a civilização na perspetiva de cuidar da aparência e limpeza. O produto cosmético tem uma história de vários milhares de anos através do uso de ingredientes de fontes vegetais, animais e minerais (Okereke et al., 2015).

A necessidade de produtos ausentes de efeitos colaterais, livres de compostos sintéticos nocivos que podem causar danos na saúde, contribui para o aumento da pesquisa de produtos de origem natural (Joshi LS & HA, 2015; Kumar et al., 2016). Além disso, nos produtos naturais existe um conjunto vasto de compostos bioativos de

importante valor farmacológico e tecnológico, como é o caso dos antioxidantes naturais e conservantes naturais (Burlando et al., 2010). Em comparação com os produtos sintéticos, os produtos de origem natural são hipoalergénicos, por não causarem graves problemas à pele (Kumar et al., 2016). Compostos químicos amplamente utilizados na cosmética como polietilenoglicóis, óleos minerais, metais pesados (chumbo, arsénio, níquel) são considerados tóxicos, causando diversos efeitos colaterais como alergias e irritações que podem levar a inúmeras doenças (Okereke et al., 2015). Vários estudos demonstraram que alguns ingredientes usados em cosméticos podem aumentar o risco de cancro de mama, agindo como desreguladores endócrinos, que se assemelham aos estrogénios. Os parabenos, usados mundialmente como conservantes em champôs, cremes faciais e loções corporais, são desreguladores endócrinos conhecidos e tem sido associado ao cancro de mama (Garner et al., 2014).

Com o crescimento do interesse em formulações de origem natural, cresce no mundo um consumidor cada vez mais adepto de produtos elaborados com base em produtos naturais, como no caso dos desenvolvidos pela indústria de cosméticos (Vasiljević & Bojović, 2018).

1.1.2. Estabilidade dos Produtos cosméticos

O teste de estabilidade pode ser definido como o processo de avaliação de um produto para garantir que determinados parâmetros permanecem dentro das diretrizes aceitáveis. Definir os parâmetros cruciais requer uma combinação de conhecimentos químicos sobre a fórmula e sobre o uso do produto. O produtor deve ter a consciência de que os produtos cosméticos não devem apenas continuar a funcionar ao longo do tempo, mas também devem manter as características como, o aspeto, o aroma e a cor ao longo do tempo. Portanto, o teste de estabilidade deve avaliar as características organolépticas, além das suas propriedades funcionais. Neste contexto, o produtor deve determinar quais são as características do produto que podem alterar ao longo do tempo e desenvolver testes apropriados para medir a extensão das mudanças (Knowlton & Pearce, 2014).

A aplicação de extratos naturais em formulações cosméticas, é uma tendência nas últimas décadas, exigindo a sua caracterização e tendo de ser considerados aspetos

relacionados com a sua estabilidade física e química, quando incorporados em formulações. Testes físicos e a estabilidade química destas, tornam-se importantes parâmetros que, devem ser considerados no processo de preparação, armazenamento e aplicação dos produtos formulados (Isaac et al., 2008).

O estudo da estabilidade fornece indicações acerca do comportamento do produto cosmético durante um determinado intervalo de tempo, perante condições ambientais a que possa ser sujeito desde o momento de fabricação, até ao limite do prazo de validade.

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, o estudo da estabilidade de produtos cosméticos fornece informações que indicam o grau de estabilidade relativa de um produto nas variadas condições a que possa estar sujeito desde sua fabricação até o término de sua validade. Essa estabilidade é relativa, pois varia com o tempo e em função de fatores que aceleram ou retardam alterações nos parâmetros do produto.

A elaboração dos estudos da estabilidade de produtos cosméticos contribui para:

- Orientar o desenvolvimento da formulação e do material de acondicionamento adequado;
- Fornecer indicações para o aperfeiçoamento das formulações;
- Estimar o prazo de validade e fornecer informações para a sua confirmação;
- Monitorizar a estabilidade organoléptica, físico-química e microbiológica, produzindo informações sobre a fiabilidade e segurança dos produtos.

A estabilidade de um produto cosmético é influenciada por diversos fatores externos e internos. Os fatores externos são os fatores a que o produto se encontra exposto como: tempo, temperatura, luz, ar, humidade, microrganismos, acondicionamento e vibração. Os fatores internos, são fatores relacionados com a própria natureza das formulações e sobretudo com a interação de seus ingredientes entre si e/ou com o material de acondicionamento. Resultam em incompatibilidades de natureza física ou química que podem, ou não, ser visualizadas pelo consumidor (Ribeiro et al., 1996).

As características organolépticas (aspeto, cor, odor), o valor do pH, densidade e a textura, constituem os parâmetros mais utilizados para avaliar a estabilidade de um produto (Claro Jr., 2001).

Os ensaios de estabilidade incluem testes de estabilidade preliminar e testes de estabilidade acelerada. O teste de estabilidade preliminar é realizado num curto intervalo de tempo e consiste em realizar ensaios que auxiliem na monitorização da estabilidade organoléptica, físico-química e microbiológica, entre os quais a avaliação do aspeto, cor, odor, pH, textura, densidade, centrifugação entre outros (Isaac et al., 2008). Por outro lado, o teste de estabilidade acelerada, fornece dados que permitem efetuar uma previsão para a estabilidade do produto e estimar o prazo de validade. Inclui ciclos de congelamento/descongelamento, exposição a radiação luminosa, entre outros, realizados em condições extremas de armazenamento (Issac et al., 2008; Barata, 2002).

1.2. *Humulus lupulus L.*

1.2.1. Classificação botânica e aspetos morfológicos da planta

O *Humulus lupulus L.*, mais conhecido por lúpulo, é uma planta perene dioica pertencente a família das *Cannabaceae* da ordem *Urticales* (Almaguer et al., 2014; Karabín et al., 2016; Önder et al., 2013; Sousa, 2005; J. A. N. F. Stevens et al., 1997). O género *Humulus* inclui duas outras espécies, *Humulus japonicus* e *Humulus yunnanensis*, sendo que o *Humulus lupulus L.* e *Humulus japonicus* possuem importância a nível industrial e na medicina tradicional (Karabín et al., 2016; Sung et al., 2015).

O lúpulo cresce em solos ricos em matéria orgânica, utilizando como suporte de crescimento árvores, muros ou paredes altas, tendo como uma das suas características particulares o seu crescimento rápido. Chegam a atingir 7 a 9 metros de altura, em menos de 5 meses (Sousa, 2005). Na Primavera e início do Verão, as plantas crescem enrolando-se aos suportes, segurando-se a estes graças aos tricomas em forma de bigorna ou ganchos que revestem os caules (Sousa, 2005). As folhas são de cor verde-escuras, em forma de coração com 3 a 5 lóbulos, dentadas e com uma superfície muito rugosa (Zanoli & Zavatti, 2008).

Os cones do lúpulo (Figura 1) são estruturas semelhantes a pétalas, chamadas brácteas e bractéolas em torno de um eixo central. Na base das bractéolas, as glândulas de lupulina são formadas à medida que o lúpulo amadurece (Almaguer et al., 2014). Os cones do lúpulo são as únicas estruturas capazes de segregar glândulas de lupulina (Almaguer et al., 2014; Zanolli & Zavatti, 2008).



Figura 1 - A) Campos de lúpulo; B) Cones de lúpulo; C) Glândulas de lupulina; Adaptado: (Sousa, 2005).

Por se tratar de uma planta dioica, a morfologia das suas flores (cones) é facilmente distinta em cada um dos sexos. Nenhuma outra diferença morfológica identifica o sexo da planta. As inflorescências masculinas apresenta panículas multiflorais com cerca de 10 cm de comprimento, enquanto que as inflorescências femininas são amentilhos semelhantes a cones e, dependendo da variedade, quando completamente desenvolvidos, atingem cerca de 5 a 6 cm (Sousa, 2005; Zanolli & Zavatti, 2008).

1.2.2. Cultura do lúpulo

O cultivo do lúpulo (*Humulus lupulus L.*) destina-se sobretudo à indústria da cerveja. O uso de lúpulo no fabrico de cerveja deve-se à existência da lupulina (pó produzido nas flores femininas), que confere o gosto amargo e o sabor à cerveja. Em Portugal, o lúpulo cultivado destina-se exclusivamente ao fabrico de cerveja. 98% do lúpulo produzido no mundo é utilizado na fabricação da cerveja (Almaguer et al., 2014; Kowalczyk et al., 2013; Zanolli & Zavatti, 2008). Primeiramente, o lúpulo era usado para proteger a cerveja de contaminações microbiológicas (Almaguer et al., 2014; Zanolli & Zavatti, 2008). Mais tarde começou a ser utilizado para conferir aroma à cerveja. O lúpulo é capaz de

estabilizar a espuma da cerveja devido aos seus componentes altamente hidrofóbicos (iso α -ácidos). Os flavonóides são compostos importantes para a produção da cerveja e para a qualidade da mesma. Possuem propriedades antioxidantes que protegem contra a oxidação das resinas do lúpulo (Karabín et al., 2014).

O *H.lupulus* é provavelmente originário da China, uma vez que todas as espécies de *Humulus* foram encontradas em regiões do país, sendo este o responsável pelas primeiras distribuições do lúpulo pelo mundo, nomeadamente para o Japão, a América e Europa (Karabín et al., 2016; Zanolli & Zavatti, 2008). Sugere-se que o nome *Humulus* tenha vindo do Humús, o solo húmido em que a planta cresce (Zanolli & Zavatti, 2008).

Na atualidade, esta espécie é cultivada na Europa central e em todas as regiões temperadas do mundo (Almaguer *et al.*, 2014; Sousa, 2005; J. A. N. F. Stevens et al., 1997; Zanolli & Zavatti, 2008). Embora a origem da sua comercialização seja europeia, a sua distribuição e exploração atual expande-se pela América do Sul, África do Sul, Nova Zelândia e Austrália, onde as regiões de maior produção se situam na Europa, Região Nordeste dos E.U.A., Austrália, Nova Zelândia e África do Sul (Sousa, 2005). Atualmente, os maiores produtores de lúpulo do mundo são a Alemanha, os E.U.A, China e República Checa (Karabín et al., 2016). Na flora espontânea da Roménia, o lúpulo cresce em áreas de sombra perto dos rios à beira das florestas, através de bosques, cultivadas como culturas ou plantas decorativas. Os maiores campos de lúpulo podem ser encontrados na Transilvânia, onde os cones são valorizados pela indústria cervejeira (Arsene et al., 2015).

A utilização do lúpulo na medicina tradicional remonta a mais de 2000 anos, onde era utilizado no combate contra a lepra, o mau odor dos pés, constipação e a purificação do sangue, pelos antigos curandeiros (Karabin et al., 2014; Karabín et al., 2016). Em particular, as preparações de lúpulo eram recomendadas para o tratamento de distúrbios do sono, como um sedativo leve, e para a ativação da função gástrica (Kowalczyk et al., 2013; Önder et al., 2013; Zanolli & Zavatti, 2008).

1.2.3. Composição química do lúpulo

O lúpulo é constituído por compostos amargos conhecidos como ácidos alfa e ácidos beta, por óleos essenciais, polifenóis e resinas totais, sendo os compostos amargos, os compostos de presença universal (European Medicines Agency, 2014; Miranda, 2015; Sousa, 2005). Além destes compostos, dentro da composição nutricional da planta, ainda podemos encontrar proteínas, polissacarídeos e minerais (European Medicines Agency, 2014). No esquema a baixo (Figura 2) então representados os compostos do lúpulo presentes nos cones (inflorescências femininas) da planta.

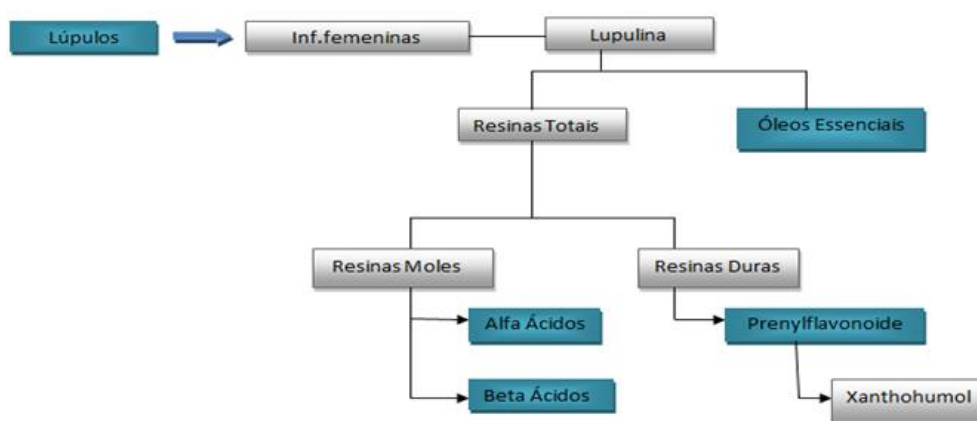


Figura 2 - Composição química dos cones do lúpulo.

1.2.3.1. Lupulina

Os cones do lúpulo (inflorescências femininas), produzem um pó amarelo a que podemos chamar de lupulina. Dentro das glândulas de lupulina, encontram-se compostos como resinas, ácidos amargos, óleos essenciais e os prenilflavonóides (Karabin et al., 2014; Miranda, 2015). Os ácidos alfa e ácidos beta (tabela I), são os compostos maioritários do pó de lupulina (Sousa, 2005).

Tabela I - Composição geral de cones do lúpulo seco. Adaptado de: Zanoli & Zavatti, 2008.

Composição	Peso %
Ácidos Alfa	2-12%
Ácidos Beta	1-10%
Óleos Essenciais	0.5-1.5%
Flavonóides	0.5-1.5%
Ácidos Fenólicos, Proteínas	15%
Polissacarídeos	40-50%
Polifenóis	3-6%

a) Resinas

As resinas dividem-se em resinas moles e resinas duras. As resinas moles são conhecidas como solúveis em hexano e as resinas duras solúveis em metanol (Miranda, 2015). Das resinas moles fazem parte os ácidos alfa e os ácidos beta, que constituem a fração mais importante do lúpulo, e são segregados pelas glândulas de lupulina dos cones de lúpulo (Almaguer et al., 2014; Karabín et al., 2016; Sousa, 2005). Os ácidos alfa também conhecidos como humulonas (Zanoli & Zavatti, 2008), conferem à cerveja o gosto amargo e são responsáveis pela estabilidade da espuma da cerveja (Almaguer et al., 2014; Miranda, 2015). As suas formas isomerizadas são os responsáveis por transmitir essas características a cerveja (Miranda, 2015). Os ácidos alfa são constituídos por humulonas com três formas, que diferem num radical, podendo assim ser n-humulonas, co-humulonas e ad-humulonas (Figura 3), sendo estes os radicais de maior importância (Karabín et al., 2016; Miranda, 2015). Os ácidos beta, também conhecidos como lupulonas (Zanoli & Zavatti, 2008), são também precursores do gosto amargo da cerveja, mas de uma forma mais grosseira. São ainda constituídos por lupulonas, aparecendo também nas três formas n, co e ad por substituição do radical (R) na sua estrutura química (Miranda, 2015).

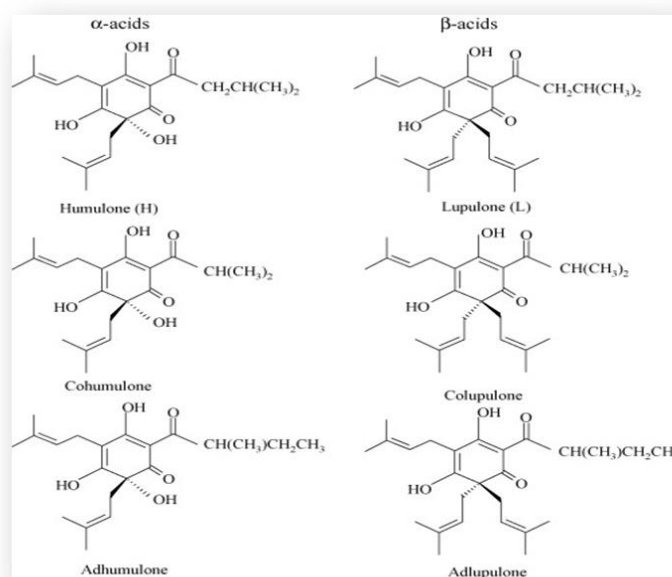


Figura 3 - Estruturas químicas dos ácidos amargos do lúpulo (Zanoli & Zavatti, 2008).

b) Óleos essenciais

Os óleos essenciais são misturas complexas de compostos de baixo peso molecular extraídos das plantas por destilação por arrastamento de vapor. Terpenóides e fenilpropanóides são os constituintes principais que fornecem aroma característico e propriedades biológicas aos óleos essenciais. Estes são indicados para uma variedade de problemas de saúde por sistemas tradicionais de medicina, em todo o mundo. São-lhes atribuídas várias atividades farmacêuticas e biológicas como antibacterianas, antifúngicas, anticancerígenas, anti mutagênicas, antidiabéticas e antivirais (Raut & Karuppayil, 2014).

Os óleos essenciais do *H. lupulus L.*, são os responsáveis por conferir à cerveja o seu perfil aromático (Almaguer et al., 2014; Karabin et al., 2014; Karabín et al., 2016; Miranda, 2015). Constituem um grupo diversificado de compostos com diferentes propriedades físico-químicas, biológicas e organolépticas, segregados pelas glândulas de lupulina (Karabín et al., 2016). Os óleos essenciais encontram-se divididos em hidrocarbonetos (monoterpenos, sesquiterpenos e hidrocarbonetos alifáticos),

compostos oxigenados (álcoois terpenos, álcoois sesquiterpénicos e outros compostos oxigenados), compostos que contêm enxofre, sulfuretos e outros compostos de enxofre (Karabín et al., 2016; Miranda, 2015). Durante o amadurecimento, processamento e armazenamento do lúpulo dá-se a fração oxigenada. A fração de enxofre representa uma pequena parte do total dos óleos essenciais, tendo um limiar de sabor muito baixo. É uma fração com pouca atividade biológica (Karabín et al., 2016).

c) Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos são classificados como fenóis simples ou polifenóis, com base no número de unidades de fenol na molécula. Vários estudos epidemiológicos, clínicos e *in vitro*, têm demonstrado múltiplos efeitos biológicos relacionados com compostos fenólicos, tais como: atividade antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e anticarcinogénica, entre outros (Roriz et al., 2015).

Os compostos fenólicos compreendem de 3% a 6% do peso seco dos cones do lúpulo, localizados portanto nos cones da planta com exceção dos prenilflavonóides, segregados pelas glândulas de lupulina (Karabín et al., 2016; Zanolli & Zavatti, 2008). Estão divididos em 4 grupos, flavonóides, flavan-3-ols, ácidos carboxílicos fenólicos e outros compostos fenólicos (prenilflavonóides, estilbenóides) (Karabín et al., 2016). A quercetina, kaempferol e miricetina são os flavonóides dominantes estando a maioria presentes na forma de glicosídeos, onde o D-glicose e L-ramnose são os grupos de açúcar mais frequentes. Os prenilflavonóides têm sido a classe de polifenóis mais discutida, exibindo fortes atividades biológicas e benefícios para a saúde humana. O humol, isoxantohumol, desmethyl xantohumol, e 6- e 8-prenil-naringenina, constituem os principais prenilflavonóides do lúpulo (Karabín et al., 2016).

Os flavonóides são metabolitos secundários da classe dos polifenóis, sendo considerados dos mais abundantes no reino vegetal. Geralmente estão presentes nas partes aéreas das plantas de diferentes ecossistemas de todo o mundo. Os efeitos benéficos associados ao consumo de frutas e vegetais tem sido em grande parte atribuídos aos flavonóides, uma vez que se associam diversos efeitos biológicos a esta classe de

substâncias, incluindo atividade antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, hormonal e atividade anticancerígena, entre outras (Fraga et al., 2010). A sua capacidade antioxidante é uma das propriedades mais conhecidas e relevante. Os flavonóides têm uma série de funções fisiológicas importantes nas plantas, nomeadamente no desenvolvimento da raiz, germinação das sementes, proteção de raios ultravioletas do sol, interação planta-bactéria e defesa da planta contra agentes patogénicos, predadores e stress ambiental (Falasca et al., 2014).

O material vegetal descartado na fabricação da cerveja, é enriquecido com flavonóides prenilados bioativos, parecendo ser benéficos para a saúde da própria planta. O isoxanthohumol (IX), 8-prenilnaringenina (8-PN) e 6-prenilnaringenina (6-PN) são flavonóides prenilados bioativos menos abundantes, mas importantes (Bolton et al., 2019).

1.2.4. Propriedades Farmacológicas e Biológicas do lúpulo

Embora as inflorescências femininas (cones) do lúpulo sejam conhecidas como matéria-prima rica em resinas, que conferem o sabor amargo, e óleo essencial que confere o aroma característicos à cerveja (Arsene et al., 2015; Durello et al., 2019; European Medicines Agency, 2014; Karabín et al., 2016; SEGAWA et al., 2006), os cones do lúpulo têm vindo a ser utilizados para fins medicinais, por revelarem benefícios para a saúde (Karabín et al., 2016; Zanolli & Zavatti, 2008). A planta do lúpulo, tem demonstrado um vasto leque de propriedades farmacológicas, como efeito anti-inflamatório (European Medicines Agency, 2014; Karabín et al., 2016), atividade antioxidante (Kowalczyk et al., 2013; Önder et al., 2013), efeito inibitório na reabsorção óssea (SEGAWA et al., 2006), propriedades sedativas e neuro farmacológicas (European Medicines Agency, 2014; Karabín et al., 2016; Kowalczyk et al., 2013; Önder et al., 2013; Zanolli & Zavatti, 2008), propriedades estrogénicas do fito estrógeno 8-prenilnaringenina (European Medicines Agency, 2014; Karabín et al., 2016; SEGAWA et al., 2006; Zanolli & Zavatti, 2008), atividade quimiopreventiva (SEGAWA et al., 2007; Zanolli & Zavatti,

2008)(European Medicines Agency, 2014)(Önder et al., 2013), propriedades antialérgicas (SEGAWA et al., 2006, 2007), entre outras.

Em consonância, vários estudos fitoquímicos da planta foram realizados para investigar e identificar compostos de importância farmacológicas, tais como os polifenóis (flavanonas, chalconas), óleos essenciais e as resinas (Karabín et al., 2016; Zanolli & Zavatti, 2008). Considera-se até ao momento que os ácidos amargos e os prenilflavonóides são os principais componentes fitoquímicos responsáveis pelo valor medicinal das resinas de lúpulo (Frag & Wessjohann, 2013).

Os prenilflavonóides são considerados fitoestrógenos com elevado potencial para aplicação em programas de prevenção do cancro e na prevenção ou tratamento das ondas de calor (pós-menopausa) e osteoporose (Karabin et al., 2014; Karabín et al., 2016; J. F. Stevens & Page, 2004; Zanolli & Zavatti, 2008) (J. F. Stevens & Page, 2004). Das chalconas preniladas presentes no lúpulo, o xanthohumol demonstrou atividade quimiopreventiva em modelos experimentais *in vitro* (J. F. Stevens & Page, 2004; Zanolli & Zavatti, 2008).

Os flavonóides têm apresentado também benefícios a saúde, demonstrando ter propriedades antialérgicas, anticoagulantes, antiagregantes plaquetários e assumir atividades anti-colinesterásicas (estratégia terapêutica na doença de Alzheimer) (Karabin et al., 2014).

Os ácidos alfa, tem vindo a demonstrar bloquear o desenvolvimento de várias doenças complexas, como síndrome metabólica (Karabín et al., 2016).

Para além das várias atividades atribuídas aos compostos do lúpulo, os cones de lúpulo têm vindo a revelar atividade antifúngica e antibacteriana (European Medicines Agency, 2014; Karabín et al., 2016; Önder et al., 2013). Numerosos estudos demonstraram em nível de laboratório e de campo, que os extratos de plantas contêm diversos componentes bioativos que podem controlar o crescimento de fito-patógenos. Por outro lado, as plantas medicinais são uma fonte rica de compostos terapêuticos que são utilizados na indústria farmacêutica, também como antimicrobianos (Bartmańska et al., 2018). Recentemente, há um interesse crescente na pesquisa do possível uso de

produtos naturais, como extratos de plantas, que podem ser menos prejudiciais para o controle de patógenos fúngicos (Actions et al., 2004).

Por razões ecológicas e económicas, o interesse nos resíduos vegetais como fonte de compostos com atividade antimicrobiana aumentou significativamente, com especial atenção aos compostos polifenólicos, que, como fatores naturais que protegem as plantas contra infeções, frequentemente se tornam objeto de pesquisas anti-infeciosas (Bartmańska et al., 2018).

Por outro lado, nos últimos anos, tem aumentado em grande escala a resistência aos antibióticos, por parte de alguns agentes patogénicos, constituindo uma preocupação crescente. Com efeito, a seleção de estirpes resistentes ocorre tão rapidamente para algumas combinações (bactéria/antibacteriano) que a utilidade clínica do fármaco é severamente diminuída, o que poderá implicar que as bactérias resistentes se tornem mais populosas que as restantes (Actions et al., 2004).

Os fármacos com atividade antimicrobiana e com origem em fontes naturais, como por exemplo as plantas, surgem assim como uma fonte promissora no campo da antibioterapia, particularmente devida a sua diversidade estrutural na natureza e devido ao facto de estas terem sido compostas evolutivamente, tornando-se efetivas na erradicação do microrganismo específicos (Actions et al., 2004).

No caso particular do lúpulo, a sua atividade antibacteriana é atribuída aos ácidos alfa e ácidos beta, principalmente para as bactérias Gram-positivas. O envolvimento da atividade antibacteriana dos ácidos amargos nas bactérias Gram-positivas, incluindo algumas espécies de *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Mycobacterium* e *Streptomyces*, relaciona-se com o rompimento primário da membrana, devido as interações das partes hidrofóbicas das moléculas com a parede celular bacteriana (Zanoli & Zavatti, 2008). No mecanismo de inibição de células sensíveis pelos ácidos amargos do lúpulo, os ácidos beta e os ácidos alfa são incorporados nas membranas celulares onde atuam como ionóforos. Estes realizam, processos de catalisação incluindo o influxo eletro-neutro de moléculas não dissociadas, troca de protões por catiões bivalentes (Mn^{2+}) e o escoamento do complexo resultante, resultando no acúmulo intracelular de protões, dissipação do

gradiente de prótons transmembranares, diminuição da absorção de nutrientes induzida pela força prótonica, à fome e por fim morte celular (Karabín et al., 2016).

Este efeito não se aplica a todos os microrganismos, sendo que alguns desenvolveram mecanismos para aumentar sua resistência a esse efeito. Em algumas bactérias Gram-negativas como *Pectinatus cerevisiiphilus*, *Pectinatus frisingensis* e *Megasphaera revisiae*, as suas membranas celulares reduzem a entrada de substâncias não polares, tornando os microrganismos anaeróbios quase totalmente resistentes aos compostos do lúpulo. Outras bactérias resistentes aos compostos do lúpulo são capazes de excluir esses compostos através de uma bomba de resistência a múltiplas drogas ou a transportadores dependentes da diminuição da absorção de nutrientes, enviando prótons para fora da célula. A atividade antibacteriana dos ácidos alfa e dos ácidos beta diferencia da atividade antibacteriana dos iso- α -ácidos, sendo a atividade antibacteriana dos ácidos alfa e beta maiores, embora na prática, devido à sua menor solubilidade na cerveja, sua eficiência seja menor que os iso- α -ácidos. Os ácidos do lúpulo são ácidos fracos, apresentando apenas formas não dissociadas ativas, resultando que os efeitos antibacterianos diminuem com a diminuição do pH. Os efeitos antimicrobianos do ácido humulínico, um derivado dos ácidos iso- α , foram estudados e obteve-se uma concentração inibitória mínima (CIM) de 1,4 μ l para *Lactobacillus brevis*, que revelou-se como o menor CIM de todas as substâncias do lúpulo estudadas (Karabín et al., 2016).

Óleos essenciais obtidos por hidrodestilação e clorofórmio de diferentes culturas de lúpulo, revelaram atividade antimicrobiana contra as bactérias Gram-positivas como o *Staphylococcus aureus*, mas não influenciaram o crescimento de bactérias Gram-negativas como a *Escherichiacoli* nem sobre o fungo *Candida albicans* (Karabín et al., 2016; Zanolli & Zavatti, 2008). Revisões recentes sobre as propriedades anti-infecciosas dos constituintes do lúpulo descreveram o xanthohumol como um agente anti-infeccioso de amplo espectro contra as bactérias Gram-positivas como o *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*, contra vírus como o citomegalovírus, vírus do herpes simples tipo 1 e tipo 2 e vírus da imunodeficiência humana, contra fungos como

o *Trichophyton spp* e contra os protozoários da malária, o *Plasmodium falciparum* (Zanoli & Zavatti, 2008).

Relativamente aos polifenóis, as suas atividades antimicrobianas baseiam-se na inibição da replicação de microrganismos, incluindo bactérias, fungos, parasitas, vírus e protozoários. A sua atividade antimicrobiana envolve a capacidade de se acumular dentro das células, ou penetrar nas membranas das células fosfolipídicas e provocar inibição, e depende, particularmente, do seu carácter hidrofóbico, dado a sua interação com a parede celular bacteriana. Assume-se que, os polifenóis se comportam de forma sinérgica com vários antibióticos contra os microrganismos multirresistentes. Os polifenóis que apresentam estrutura flavan, como o flavan-3-ols, flavonóis e taninos, são particularmente ativos e exercem atividades inibitórias contra uma ampla gama de bactérias Gram-positivas, incluindo *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Actinomyces naeslundii*, *Streptococcus mutans* e *Colistridium perfringens* e contra bactérias Gram-negativas como *Prevotella oralis*, *Prevotella melaninogenica*, *Fusarium nucleatum* e a *Escherichiacoli*. Os prenilflavonóides exibem atividades antibacterianas, especialmente contra certas bactérias Gram-positivas dos géneros *Staphylococcus* e *Streptococcus*. As atividades antifúngicas dos prenilflavonóides incluem a capacidade do xanthohumol e da 6-prenilnaringenin em inibir o crescimento dos fungos dermatolíticos *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum* (Karabín et al., 2016).

1.3. Óleos essenciais

As plantas são uma fonte inesgotável de produtos naturais, muitos deles metabolitos secundários, que o Homem utiliza nas mais diversas indústrias, nomeadamente na indústria alimentar, cosmética e perfumaria. De entre os compostos produzidos pelas plantas, aos óleos essenciais atraíram a atenção, por aliarem o seu aroma às reconhecidas propriedades antimicrobianas e antioxidantes (Figueiredo et al., 2014).

Um óleo essencial é internacionalmente definido como o produto obtido, de uma planta ou das suas partes, por destilação (hidrodestilação ou destilação com arrastamento

por vapor de água), ou, em caso dos citrinos, por processo mecânico apropriado sem aquecimento, designado prensagem (Figueiredo et al., 2014).

1.3.1 Extração de óleos essenciais

A extração de óleos essenciais é um processo pelo qual se obtém um soluto ou uma mistura de compostos, a partir de material vegetal, extraídos em meio sólido ou líquido. O solvente utilizado pode ser a água ou um solvente miscível ou imiscível em água (Santos et al., 2006).

Entre os métodos utilizados para obtenção de óleos essenciais, estão os métodos de destilação por arraste de vapor e hidrodestilação, sendo a hidrodestilação o mais utilizado (Santos et al., 2006)

A destilação caracteriza-se como processo de separação de misturas líquidas com base na diferença de composição dos constituintes nas fases líquidas e de vapor em equilíbrio, dada à diferença de volatilidade entre os componentes do líquido (Santos et al., 2006).

A extração por hidrodestilação com recurso a um Clevenger, a matriz é imersa em água destilada e o processo é realizado à temperatura de ebulição da mistura (Santos et al., 2006) . A hidrodestilação e a destilação por arraste de vapor, são definidas como as técnicas de destilação mais simples. Ambas são realizadas em destiladores básicos com uma única caldeira, aquecida diretamente, onde ocorre a completa imersão da planta em água. Após o aquecimento ocorre a evaporação dos compostos voláteis junto com o vapor de água, de seguida ocorrendo a condensação permitindo a separação do óleo da água, dada a natureza dos compostos. Estas destilações são consideradas menos dispendiosas comparadas as outras técnicas de destilação. Em contrapartida, o fato de haver aquecimento direto, conduz a ocorrência de degradações e/oxidações do material vegetal e conseqüentemente perda de alguns constituintes do óleo essencial, o que vem tornando cada vez menos frequente a utilização das mesmas (Taârit et al., 2012).

1.3.2 Óleo essencial de *Thymus zygis* subsp. *zygis*

O género *Thymus*, pertence à família Lamiaceae e inclui 350 espécies de ervas perenes, subarborescentes e aromáticas, nativas da Europa e do Norte da África, sendo muitas delas endémicas da região mediterrânea. As plantas do *Thymus* geralmente crescem em rochas, pedras ou areias e em locais ensolarados. Comum em Portugal e Espanha, o *Thymus zygis* é comumente chamado de erva-de-Santa-Maria, sal-da-terra, serpão-do-monte (português), tomilho-branco, entre outros. Em Portugal, *Thymus zygis* é com frequência encontrado na região central e o nordeste do país e é tradicionalmente usado na preservação de alimentos (azeitonas), como condimento (queijo, peixe, carne, saladas, molhos), como tónico digestivo e no tratamento de resfriados e dores de garganta (Silva et al., 2020). Apenas duas subespécies de *Thymus zygis* são encontradas em Portugal, *T. zygis* subsp. *zygis* e *T. zygis* subsp. *sylvestris*, que apresentam diferenças em algumas características botânicas, no número de cromossomas e ecologia (Silva et al., 2020).

O *Thymus* é uma planta produtora de óleo essencial com grande relevância para a indústria alimentícia, cosmética, farmacêutica e perfumaria. Várias espécies de tomilho são usadas há muito tempo em culinária e seus óleos essenciais como ingredientes aromatizantes em alimentos, bebidas, bem como aromas em sabonetes e perfumes. Está incluído também, em remédios tradicionais e suplementos alimentares com base em suas atividades biológicas (Zuzarte et al., 2013). São consideradas dotadas de propriedades benéficas à saúde, incluindo atividades antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, cardioprotetora, neuroprotetora, anticarcinogénica e hipoglicémica, propriedades estas que estão associadas ao óleo essencial (Afonso & Pereira, 2020).

O óleo essencial de tomilho, apresenta odores e sabores distintos dependentes dos seus constituintes. São caracterizados por possuírem fortes odores característicos, incolores e com uma densidade inferior à água (Miguel, 2010).

O *Thymus zygis* subespécie *zygis* (Figura 4) é um subarbusto de 10 cm a 30 cm de porte, com caules puberulentos, ascendentes, com folhas de 4,5 mm a 9 mm por 0,6 mm a 1 mm, lineares, subagudas, sesséis, tomentosas, de margens revolutas e esparsamente ciliadas na base.



Figura 4 – *Thymus zygis* subsp. *zygis* da zona de Rebordãos, Bragança, Portugal.

As suas inflorescências são formadas por verticilastros até 10 cm, espiciformes ou capituliformes, de brácteas semelhantes as folhas. Os cálices são verde-acinzentado, com 3 a 4 mm, tomentoso e com dentes superiores largos e compridos (Morales, n.d.).

1.3.2.1. Composição química do *Thymus zygis* subsp. *zygis*

Os óleos essenciais possuem uma composição química complexa que inclui diversos voláteis, como terpenos, aldeídos, álcoois, fenóis e terpenóides (Tongnuanchan et al., 2014). As condições ambientais, a espécie e o quimiotipo, influenciam a composição química do óleo essencial (El Abed et al., 2014).

O género *Thymus* compreende diferentes quimiotipos (variação química na mesma espécie), dependendo do componente principal do óleo essencial. O timol e ρ -cimeno, foram relatados como os principais compostos químicos presentes no óleo essencial de *Thymus zygis* (Pina-Vaz et al., 2004).

Estudo realizado por Dandlen *et al.*, (2011), referencia o carvacrol, o ρ -cimeno e o Υ -terpinemo, como os três principais compostos presentes no óleo essencial de *Thymus zygis* subsp. *zygis*, recolhido m Rebordãos, Bragança, Portugal (Tabela II).

Tabela II - Principais compostos do óleo essencial obtido a partir das partes aéreas de *Thymus zygis* subsp. *zygis* (Adaptado de: Dandlen et al., 2011)

Compostos	Percentagem Relativa (%)	Compostos	Percentagem Relativa (%)
Carvacrol	43,6	triciclono	v
P-cimeno	24,1	α -tujeno	1,6
Υ -terpinemo	15,8	α -pineno	0,8
canfeno	1,0	β -felandreno	v
3-octanol	1,0	1,8-cineole	0,2
β -micerno	1,0	limoneno	1,1
α -terpineno	1,4	Trans-sabineno hidratado	0,6
Óxido de cis-linalol	v	Óxido de β -cariofileno	0,3
Óxido de trans-linalol	v	δ -cadieno	v
α -cadinol	v	germacreno D	V
acetato de bornilo	v	trans- β -ocimen	1,1
α -terpineol	0,1	terpinen-4-ol	0,6
borneol	1,2	cânfora	V
linalol	3,2	Cis-sabineno hidratado	V

v- Vestígios (% <0,05)

1.3.2.2 Atividades biológicas e farmacológicas do óleo essencial de *Thymus zygis* subsp. *zygis*

O carvacrol, timol, p-cimeno estão presentes nos óleos essenciais extraídos de plantas do género *Thymus*. Estudos realizados, descreveram uma variedade de atividades biológicas associadas a presença destes compostos (El Abed et al., 2014).

Um óleo essencial do tomilho foi ativo contra microrganismos da pele, como *Staphylococcus epidermidis* e *Propionibacterium acnes* (Nabavi et al., 2015), atividade

esta atribuída à elevada quantidade de carvacrol que conjuntamente com o seu precursor-cimeno, causam desestabilização da membrana das bactérias (Ultee et al., 2002).

Num estudo realizado por Rota et al., onde avaliaram a atividade antimicrobiana *in vitro* de sete óleos essenciais de três espécies de *Thymus* contra 10 estirpes patogénicas, sete estirpes Gram-negativas e três estirpes Gram-positivas, os óleos essenciais revelaram forte atividade com uma zona de inibição ≥ 20 mm, atividade moderada com uma zona de inibição $< 20-12$ mm e nenhuma inibição com uma zona de inibição < 12 mm, onde a maior eficácia foi alcançada pelos óleos essenciais de *Thymus hyemalis* seguido por *Thymus zygis* e *Thymus vulgaris* (Rota et al., 2008).

O *Thymus zygis* revelou maior eficácia contra *S. aureus* do que a *E. coli* e a *C. albicans* em um estudo realizado por Cutillas et al., em que mostrou também capacidade de inibir a atividade da LOX (lipoxigenase), propriedade atribuída a alguns compostos como timol, p-cimeno, linalol e limoneno, considerados assim como potenciais agentes anti-inflamatórios (Cutillas et al., 2018).

Relativamente a atividade antifúngica do óleo essencial do género *Thymus*, os óleos essenciais de tomilho ou alguns de seus constituintes são eficazes contra uma grande variedade de fungos, particularmente os óleos com grandes quantidades de timol e/ou carvacrol (*Thymus zygis* subsp. *zygis* e *Thymus capitatus*). Foi relatado que óleo essencial de *Thymus zygis* subsp. *zygis*, possui uma potente atividade fungicida contra a *Candida albicans*, resultante do dano direto da membrana citoplasmática, dado ao efeito antifúngico sinérgico entre o timol e o p-cimeno, que é precursor do carvacrol (Pina-Vaz et al., 2004).

Cutillas, caracterizou o quimiotipo de *T. zygis* como o mais eficaz em relação a bioatividades como antioxidantes, anti-enzimáticas e antimicrobianas, devido a sua alta concentração de timol comparativamente a *T. hyemalis* (Cutillas et al., 2018).

2. Problemática

As plantas aromáticas e medicinais são muito apreciadas e utilizadas em todo o Mundo. Atualmente tem-se verificado um interesse cada vez maior na procura de compostos bioativos provenientes das plantas que possam ser aplicadas em vastas áreas, com vista à diminuição da utilização dos compostos sintéticos.

O lúpulo é conhecido como matéria prima na indústria da cerveja e também por apresentar algumas características biológicas e farmacológicas, entre elas o seu efeito sedativo, antioxidante, antibacteriano e anticancerígeno. No processo da produção da cerveja são utilizados os cones da planta, sendo que a parte vegetativa é descartada. Ainda, o perfil fitoquímico e as propriedades biológicas e farmacológicas da parte vegetativa permanecem pouco estudados ou mesmo desconhecidos.

Neste contexto, torna-se pertinente estudar as propriedades bioativas de diferentes variedades da planta *H. lupulus L.* e também investigar propriedades das partes vegetativas da planta que estão, até ao momento, pouco exploradas.

Por outro lado, tendo em conta as propriedades bioativas do lúpulo e, o crescente interesse na procura por produtos cosméticos de origem orgânica e natural, é de grande importância avaliar a estabilidade de uma formulação em gel obtida pela incorporação de extratos de cones e partes vegetativas da planta, com vista à aplicação cosmética futura.

3. Objetivos

Os seguintes objetivos foram definidos para o trabalho:

- Obter extratos hidroalcoólicos a partir de cones e partes vegetativas de lúpulo espontâneo e das variedades Polaris e Nugget;
- Obter óleo essencial de *Thymus zygis* subsp. *zygis*;
- Desenvolver formulações em gel enriquecidas com esses extratos;

- Avaliar estabilidade das formulações de gel desenvolvidas;
- Testar atividades antibacteriana e antifúngica dos extratos de lúpulo e do óleo essencial de *Thymus zygis* subsp. *zygis*;
- Efetuar análise comparativa do perfil fitoquímico dos extratos de lúpulo.

4. Materiais e Métodos

Para atingir os objetivos pretendidos neste trabalho, foram realizados os seguintes procedimentos que de seguida se detalham:

- Obtenção de plantas de *Humulus lupulus* L. (variedade Polaris, variedade Nugget e espontâneo);
- Preparação da extração hidroalcoólica de compostos fenólicos usando uma mistura de 80% de álcool e 20% de água;
- Extração do óleo essencial do *Thymus zygis* subsp. *zygis*;
- Preparação de formulações de gel de Carbopol 940®, usando extratos de lúpulo, em diferentes concentrações;
- Verificação da estabilidade do gel através de uma série de teste como características organolépticas, teste de pH, determinação da densidade, temperatura, luz, teste de centrifugação, teste de vibração e análise espectrofotométrica por UV;
- Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica dos diferentes extratos em estirpes como: *Escherichia coli* NCTC 9001, *Staphylococcus aureus* NCTC 6571 e *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10662 e *Candida albicans* ATCC 10231;
- Determinação do perfil fitoquímico dos extratos de lúpulo por LC-MS/MS;

4.1. Obtenção da Matéria-prima

Para a realização deste trabalho, foram obtidos cones e partes vegetativas (folhas, caules) de três amostras de lúpulo. As variedades Polaris e Nugget do lúpulo, foram

recolhidos na Quinta do Poulão da Escola Superior de Agrária do Instituto Politécnico de Bragança, Portugal. O lúpulo espontâneo, foi recolhido na margem do rio Fervença junto ao Centro de Ciência Viva de Bragança, Portugal, e o *Thymus zygis* subsp. *zygis* (serpão-do-monte) foi recolhido em Rebordãos, Bragança, Portugal. Todas as amostras, foram posteriormente congeladas a uma temperatura de -20 °C, para conservação e posterior utilização das mesmas.

4.2. Reagentes e Materiais

Para a realização deste estudo foram utilizados uma série de reagentes, equipamentos e matérias-primas, fornecidos pela Escola Superior de Agrária do Instituto Politécnico de Bragança: Etanol, Carbopol 940®, Glicerina, Trietanolamina, Pentano, Tween 80, DMSO, Acetona, Agar, Peptona, Meio de Mueller-Hinton, Água destilada, Acetona, Água ultrapura, entre outros.

4.3. Extração hidroalcoólica de lúpulo

A fim de preparar um gel contendo extratos hidroalcoólicos de diferentes variedades de lúpulo e de uma amostra de lúpulo espontâneo, e para avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica dos diferentes extratos e também análise do perfil fitoquímico, procedeu-se primeiramente à extração hidroalcoólica de cones e partes vegetativas de amostras das duas variedades de lúpulo e de uma amostra de lúpulo espontâneo.

Para tal, foram utilizadas 5g de cada amostra e submetidas a uma lavagem com água corrente. Posteriormente preparou-se 150 ml de uma solução de etanol (80%, v/v) que se adicionou a cada uma das amostras, ficando sob agitação durante 30 minutos, à temperatura ambiente. Passado os 30 minutos, filtraram-se os extratos e recolheu-se o líquido para um frasco de 500 ml e repetiu-se o mesmo procedimento mais duas vezes. O procedimento foi aplicado a cones e partes vegetativas das duas variedades em estudo

(Polaris e Nugget), e cones e partes vegetativas de lúpulo espontâneo. As extrações hidroalcoólicas foram armazenadas a temperatura de -20 °C.



Figura 5 – Extratos hidroalcoólicos obtidos a partir de partes vegetativas (a) e cones (b).

4.4. Extração de óleo essencial de *Thymus zygis* subsp. *zygis*

Recolheram-se amostras de *Thymus zygis* subsp. *zygis* na zona de Rebordãos, Bragança (Portugal) a fim de extrair o seu óleo essencial para usar como conservante na formulação em gel.

Para a extração do óleo essencial, recorreu-se a um Clevenger. Para tal, pesou-se 80g da amostra que foi colocado num Erlenmeyer com 800 ml de água ultrapura. Durante três horas, manteve-se o material a temperatura de 80 °C a destilar, após a água se encontrar em ebulição. Seguidamente recolheu-se o óleo e determinou-se o rendimento, e após identificação, a amostra foi armazenada a temperatura de -20 °C.

O rendimento do óleo essencial foi determinado, e expresso em ml de óleo essencial / g de matéria seca.



Figura 6 - Extração de óleo essencial com recurso a um Clevenger.

4.5. Determinação do perfil fenólico

Para a determinação do perfil fenólico das diferentes amostras de lúpulo, primeiramente procedeu-se a evaporação de 150 ml de cada extrato hidroalcoólico, recorrendo-se a um evaporador rotativo (Rotavapor R 110, Sotel). A fração resultante foi congelada e liofilizada e posteriormente utilizada para a determinação do perfil fenólico dos extratos.

O perfil fenólico dos extratos hidroalcoólicos das diferentes amostras da planta de lúpulo (10mg/mL), foi determinado por análise de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando um aparelho Ultimate 3000 Diode Array Detector (Dionex Co., San Jose, CA, EUA) equipado um espectrómetro de massa Thermo LTQ XL (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA), seguindo o método descrito por Afonso et al., (Afonso et al., 2018).

Foi inicialmente preparada mistura de 0,1% (v/v) de ácido fórmico em água, que constitui o solvente A, sendo o solvente B usado o acetonitrilo. O gradiente usado consistiu numa série de gradientes lineares a partir de 5% do solvente B e aumentando para 23% em 14,8 min, a 35% em 18 min, e a 100% em 21 min ao longo de três minutos, seguido por um retorno para as condições iniciais. As operações do espectrómetro de massa foram realizadas utilizando as condições previamente descritas no trabalho de

Afonso et al (Afonso et al., 2018). Alguns compostos fenólicos foram identificados usando compostos comerciais padrão. Nos casos em que o composto comercial padrão não estava disponível, a identificação do componente fenólico foi baseada na interpretação dos dados de espectrofotometria ultravioleta (UV) e espectrometria de massa (MS e MS/MS), além da comparação com a literatura.

4.6. Preparação das formulações em gel

Diferentes concentrações (1,5; 2,5 e 5%) de extratos hidroalcoólicos de *H. lupulus* foram incorporados, individualmente, em formulações de gel base, totalizando 60g de cada amostra, sendo que foram posteriormente armazenados à temperatura de 5°C. A base em gel foi formulada de acordo com o formulário da acofarma (anexo). A composição e as respectivas funções, estão descritas na tabela III.

Tabela III - Composição da formulação em gel.

Componentes	Montante	Funções
Carbopol 940®	1-2 %	Agente gelificante e de viscosidade
Etanol	15 %	veículo
Água Purificada	100 ml	Veículo
Trietanolamina q.s pH=7	-	Ajustador de pH
Glicerina	3-5 %	umectante

Relativamente à preparação, começou por se polvilhar o Carbopol 940® (polímero) o mais uniformemente possível sobre uma mistura de água e etanol e de seguida deixou-se repousar durante 24 horas. Após 24 horas adicionou-se o trietanolamina, até a mistura atingir um pH igual a seis. Homogeneizou-se o gel de forma a evitar a incorporação de ar. Para evitar a desidratação do gel, foi adicionado 3-5% de glicerina.

Foram elaboradas as seguintes formulações: Gel Base; Polaris vegetal (PV) 1,25%, 2,5% e 5%; Polaris flor (PF) 1,25%, 2,5% e 5%; Nugget vegetal (NV) 1,25%, 2,5% e 5%; Nugget flor (NF) 1,25% 2,5% e 5%; Lúpulo espontâneo vegetal (EV) 1,25%, 2,5% e 5% Lúpulo espontâneo flor (EF) 1,25%, 2,5% e 5%.



Figura 7 – Formulações em gel dos diferentes extratos da planta de lúpulo.

4.7. Avaliação da Estabilidade dos géis – Testes de estabilidade preliminar

4.7.1. Análise organolética das formulações

A análise organolética foi feita visualmente após a preparação das formulações em gel, com diferentes concentrações de extratos, onde se observou a cor, o cheiro e o aspeto geral das mesmas.

4.7.2. Determinação do pH

Para a medição do pH foi utilizado um medidor de pH da Inolab (pH 7310 wtw xylem brand inolab), previamente calibrado. A determinação do pH foi realizada em triplicado para cada amostra, para o que, pequenas quantidades das formulações em gel com os extratos incorporados, foram diluídas em água destilada e colocadas diretamente em contacto com o medidor de pH.

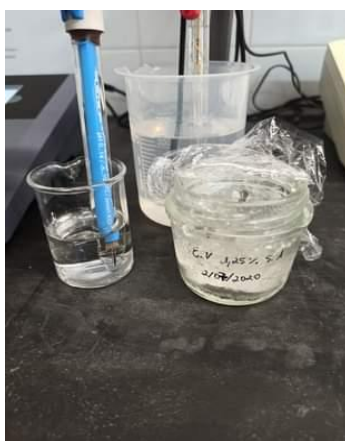


Figura 8 –Determinação do pH das formulações.

4.7.3. Avaliação da textura

Para a avaliação da textura foi utilizado o equipamento Texturómetro TA. XT. Plus Texture Analyser (Stable Mico Systems TA-XT Plus) de forma a medir os seguintes parâmetros: firmeza, consistência, coesividade e o índice de viscosidade das formulações. O aparelho está equipado com uma sonda acoplada a um disco de compressão de 35 mm que estampa uma força sobre um recipiente cilíndrico de diâmetro 50 mm. O equipamento operou a uma altura de 100 mm, a coluna tinha 50 mm de altura e o gel ocupava 50% do volume total do recipiente. Após iniciar o seu movimento, o disco de compressão exerce uma força sobre a superfície da amostra durante um curto período e desce a uma profundidade de 20 mm a uma velocidade constante e com uma velocidade de retorno de 20 mm.min⁻¹ até a superfície da amostra. Utilizou-se 50 ml de cada amostra e a análise foi feita em duplicado, à temperatura ambiente, sete dias após a preparação das amostras.



Figura 9 – Avaliação da textura.

4.7.4. Vibração Mecânica

Para o teste de vibração mecânica foram utilizados 5 g de cada amostra que, em duplicado e após 48 horas da preparação das formulações foram submetidos a vibração num agitador vórtex (Velp científica zx3 advance vortex mixer) durante 10 segundos a 2000 RPM, Este procedimento tem como objetivo replicar as condições de transporte, indicando se os movimentos de vibração do mesmo modificam a amostra.

4.7.5. Teste de Centrifugação

O teste de centrifugação indica a estabilidade de uma emulsão, uma vez que esta apresenta uma tendência a sofrer uma quebra, ocorrendo separação das duas fases. Para a realização do teste de centrifugação 48 horas após a preparação das formulações, 5 g de cada amostra foram centrifugada a uma velocidade de 3000 rpm durante 30 minutos à temperatura ambiente, numa centrífuga MIKRO 24-48 R. As análises foram realizadas em duplicado, em dois ciclos de centrifugação.



Figura 10 - Teste de Centrifugação.

4.7.5. Teste Espectrofotométrico

As formulações foram diluídas em água ultrapura na proporção de 1/100 (*m/v*) e de seguida submetidas a uma análise espectrofotométrica, tendo sido traçado o espectro na região do UV-Visível, entre 210 nm a 600 nm. Cada espectro foi comparado com o espectro obtido para a amostra de referência correspondente à formulação base. A ocorrência de variações na intensidade das bandas (efeitos hiperocrômicos ou hipocrômicos) ou de variação no comprimento de onda no qual se verifica o máximo de absorção (efeitos batocrômico ou hipocrômico) indicam a ocorrência de uma alteração na cor ou na intensidade desta, podendo ser uma indicação de instabilidade da formulação (ANVISA, 2005).

4.7.6. Densidade

Para a determinação da densidade (aparente) das formulações em gel, utilizou-se uma proveta de 25 ml e uma balança analítica. O teste foi feito em duplicado, após a elaboração das formulações, 3 e 7 dias depois, usando 5g de cada amostra. A densidade foi determinada segunda a seguinte expressão:

- $\rho = m/V$, em que ρ é a densidade m é a massa da amostra; V é a diferença do volume inicial e o volume final após adicionar a amostra.

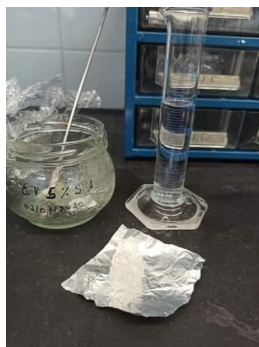


Figura 11 – Determinação da densidade aparente.

4.8. Avaliação de Estabilidade dos géis – Teste de Estabilidade Acelerada

4.8.1. Teste de Humidade Relativa

No teste de humidade relativa, 3 g de cada amostra foram armazenadas em estufa a temperaturas de 25 ± 2 °C e de 40 ± 2 °C a uma humidade relativa (H.R.) de $60 \pm 5\%$ e de $75 \pm 5\%$ respetivamente durante trinta dias. Após este período as características organoléticas de cada formulação (cor, cheiro, separação de fases) assim como o valor do pH foram analisadas de 8 em 8 dias.



Figura 12 – Teste de Humidade relativa.

4.8.2. Teste de Luz

Para a realização deste teste foi utilizado 5 g de cada amostra em duplicado e submetidas a condições extremas de luminosidade, numa embalagem de plástico transparente, com recurso a uma lâmpada dayligth, encontrando-se a lâmpada ligada durante 16 horas e durante 8 horas desligada, durante 15 dias, com o objetivo de detetar sinais de instabilidade à exposição à luz. A ocorrência de separação de fases ou a alteração da coloração dos produtos é indicativa da instabilidade do produto.

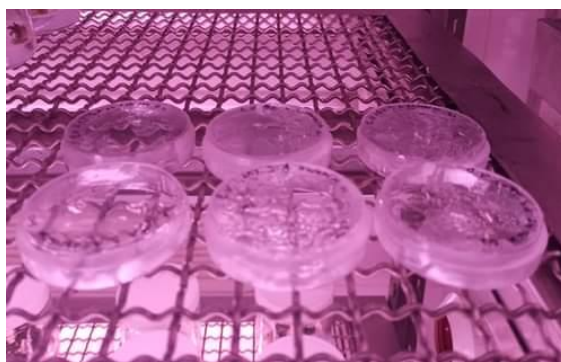


Figura 13 – Amostras expostas a lâmpada de dayligth.

4.8.3. Variação extrema da temperatura consecutiva

Testou-se a variação extrema de temperaturas consecutivas, na perspetivada observar se havia ocorrência de separação de fases, ou bolhas, ou alguma alteração na formulação que não fosse ideal para o produto cosmético.

Para tal, 3g de cada amostra foram submetidas a condições extremas de temperatura, em ciclos de congelamento e descongelamento que alternaram 24 horas com temperaturas elevadas e 24 horas com temperaturas baixas, tendo sido utilizadas as seguintes temperaturas: -12°C, 37°C, -12°C, 45°C, -12°C, 50°C e -12°C. No total foram realizados 6 ciclos (12 dias). Este mesmo método foi feito por (Vieira et al., 2009).

4.9. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica

O meio de cultura, a concentração dos inóculos, a metodologia e no caso de produtos naturais, o método de extração usado, são variáveis que podem afetar a avaliação da atividade antimicrobiana (Tajkarimi et al., 2010).

Numa primeira análise, para a avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos hidroalcoólicos do lúpulo, as estirpes bacterianas e fúngicas, foram testadas com diluições sucessivas (1:2) do extrato até a quarta diluição. Pela análise dos resultados conclui-se que por se tratar de extratos hidroalcoólicos, o solvente, etanol, inibiu o crescimento bacteriano, uma vez que não se registrou nenhum crescimento bacteriano para além do crescimento nos controlos positivos com o solvente água. Posto isto, procedeu-se a evaporação total do álcool contido nos extratos e liofilizaram-se os extratos a fim de utilizá-los para a avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica. Este mesmo procedimento foi feito em outros estudos (Chavasco et al., 2014).

Para testar a atividade antibacteriana e antifúngica dos seis extratos do lúpulo foi utilizada a concentração de 10mg/mL.

Para a realização da atividade antimicrobiana e antifúngica dos seis extratos do lúpulo, foi necessário preparar um meio especial para bactérias e leveduras, e o meio de Mueller Hinton. A composição dos meios está descrita nas tabelas IV e V abaixo. Após preparação dos meios e autoclavados durante 20 minutos, os meios foram distribuídos nas respetivas placas de Petri estéreis (leveduras e bactérias) num meio estéril (bancada de fluxo laminar).

Em simultâneo também foi preparado o meio líquido para as bactérias e as leveduras para cultivo das mesmas. Em frascos esterilizados de Erlenmeyer foram adicionados 50 ml de cada meio e incorporado colónias das bactérias e leveduras, em meio estéril. A foi incubada a 37° C durante 24 horas e a *Candida albicans* foi incubada a 25° C durante 24 horas.

Tabela IV - Composição do meio de leveduras

Meio para levedura	
Composto	g/L
Glucose	20 g
Peptona	10 g
Extrato de leveduras	5 g
Ágar	20 g
Água	1 L

Tabela V – Composição do meio de Bactérias

Meio para Bactérias	
Compostos	g/L
Extrato de Carne	3 g
Peptona	5 g
Agar	15 g
Água	1 L

4.9.1 Atividade antibacteriana – Método de microdiluição em caldo

Para a realização da atividade antibacteriana dos extratos hidroalcoólicos e do óleo essencial de *Thymus zygis* subsp. *zygis*, foi utilizado o método de microdiluição em caldo, em microplacas, para determinar a concentração mínima inibitória (MIC) e a concentração bactericida mínima (MBC) dos extratos do lúpulo e do óleo essencial de *Thymus zygis* subsp. *zygis*, usando um protocolo padrão adaptado (Afonso & Pereira, 2020).

As suspensões bacterianas foram preparadas por meio de suspensões diretas de colônias em água destilada estéril e ajustadas para obter $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (UFC) / mL, aproximadamente equivalente a 0.5 unidades de McFarland. Um

inoculo final de $1,5 \times 10^5$ UFC/mL foi necessário para, portanto, suspensões diluídas na proporção de 1:100 em caldo Mueller-Hinton. 100 microlitros de caldo Mueller-Hinton foram dispensados em poços de placas de microdiluição de 96 poços (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA). Na primeira coluna de poços, cada extrato de planta foi adicionado a uma concentração final de 10 mg/mL e em seguida diluído em série na placa para uma concentração final de 0,625 mg/ml. 100 microlitros de suspensão bacteriana foram finalmente adicionados a cada poço e as microplacas e os seus respectivos controlos foram incubados a 37° C por 24 horas. O ensaio para cada patógeno foi repetido três vezes. Todos os processos descritos foram realizados em câmara de segurança biológica de modo a garantir o máximo de condições de esterilidade.

Para cada agente microbiano, extrato e para o meio de Mueller-Hinton, foi realizado um controlo positivo e um controlo negativo, onde o controlo positivo garantisse a viabilidade do crescimento da bactéria e o controle negativo a esterilidade dos extratos da água e do meio.

Os valores de MBC foram determinados subcultivando 10 μ L da cultura de cada poço negativo em agar Mueller-Hinton e, em seguida, determinando a diluição em que o crescimento foi detetado. O solvente sem extratos serviu como controle negativo.

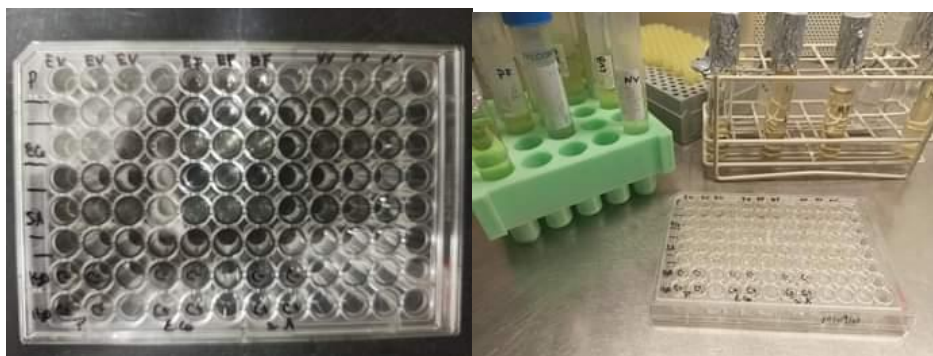


Figura 14 - Atividade antibacteriana – método de microdiluição.

Para a avaliação da atividade antimicrobiana foi utilizado as seguintes estirpes de bactérias: *Escherichia coli* NCTC 9001; *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10662 e *Staphylococcus aureus* NCTC 6571 (National Collection of Type cultures, operated by public Health England). Os microrganismos, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*

foram fornecidos pela unidade do Centro de Saúde da Sé em Bragança, Portugal e o microrganismo *Pseudomonas aeruginosa* foi obtido por isolamento, coleção da Escola Superior de Agrária do Instituto Politécnico de Bragança.

4.9.2. Atividade antifúngica – Método de difusão em agar

Para a realização da atividade antifúngica, utilizou-se o método de difusão em disco em agar. Primeiramente foram realizadas diluições seriadas (1:2) do óleo essencial em DMSO e dos extratos em Tween 80. Após ajustar o inóculo (suspensão de *Candida albicans* em meio líquido de leveduras) a 0,5 McFarland (aproximadamente 10^8 UFC/mL) utilizaram-se 100µl desta suspensão e inoculou-se em placas de Petri esterilizadas com meio de leveduras, pelo método de espalhamento. Em seguida, procedeu-se a impregnação dos discos de papel (6mm de diâmetro), previamente esterilizados, nas respetivas diluições do óleo e dos extratos de lúpulo. Utilizou-se o fluconazol como controlo positivo e discos impregnados com os solventes utilizados nas diluições (DMSO, Tween 80 e água) como controlo negativo. As placas foram incubadas 24 horas a 25° C. Após o período de incubação, mediram-se os halos de inibição (cm). Todos os processos descritos foram realizados em câmara de segurança biológica (Heraeus) de modo a garantir o máximo de condições de esterilidade.

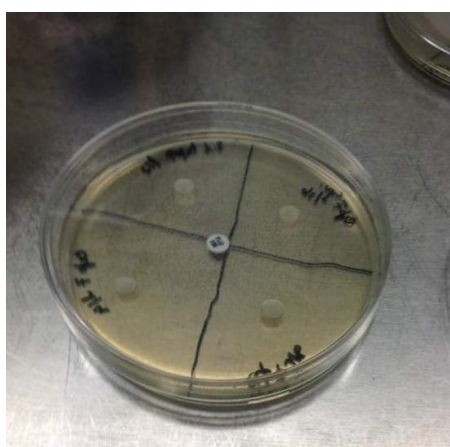


Figura 15 – Atividade antifúngica – método de difusão em disco em agar

Para a avaliação da atividade antifúngica utilizou-se a *Candida albicans* NCPF 3179, obtido por isolamento, coleção da Escola Superior de Agrária do Instituto Politécnico de Bragança.

5. Resultados e Discussão

5.1 Extratos e perfil fenólico

O rendimento dos extratos hidroalcoólicos foi calculado após liofilização e está representado na tabela VI. De acordo com o rendimento dos extratos hidroalcoólicos representado na tabela VI, o extrato hidroalcoólico do lúpulo espontâneo vegetal apresentou o maior rendimento (34,08%) com o menor rendimento obtido no extrato hidroalcoólico da variedade Nugget de lúpulo (6,13%).

Tabela VI - Rendimento dos extratos hidroalcoólicos do lúpulo.

	Massa inicial (g)	Massa obtida após liofilização (mg)	Rendimento (%)
Nugget cones	5	0,1021	6,13
Nugget vegetal	5	0,1191	7,15
Polaris cones	5	0,4299	25,79
Polaris vegetal	5	0,1965	11,79
Espontâneo cones	5	0,255	15,30
Espontâneo vegetal	5	0,568	34,08

Na tabela VII, encontram-se os resultados obtidos relativamente à composição fenólica dos três diferentes extratos dos cones e partes vegetativas do lúpulo, bem como os tempos de retenção (R_t), absorvância (λ_{max}), ião pseudomolecular ($[M-H]^-$) e os fragmentos iónicos principais (MS^2) de cada um dos compostos fenólicos presentes. Os cromatogramas obtidos a 280 nm estão representados nos gráficos I, II e III. A

identificação dos compostos fenólicos foi determinada pelos dados de tempo de retenção, máximo do espectro ultravioleta, massa do íon molecular e íões do fragmento principal em MS² e também com base em dados da literatura.

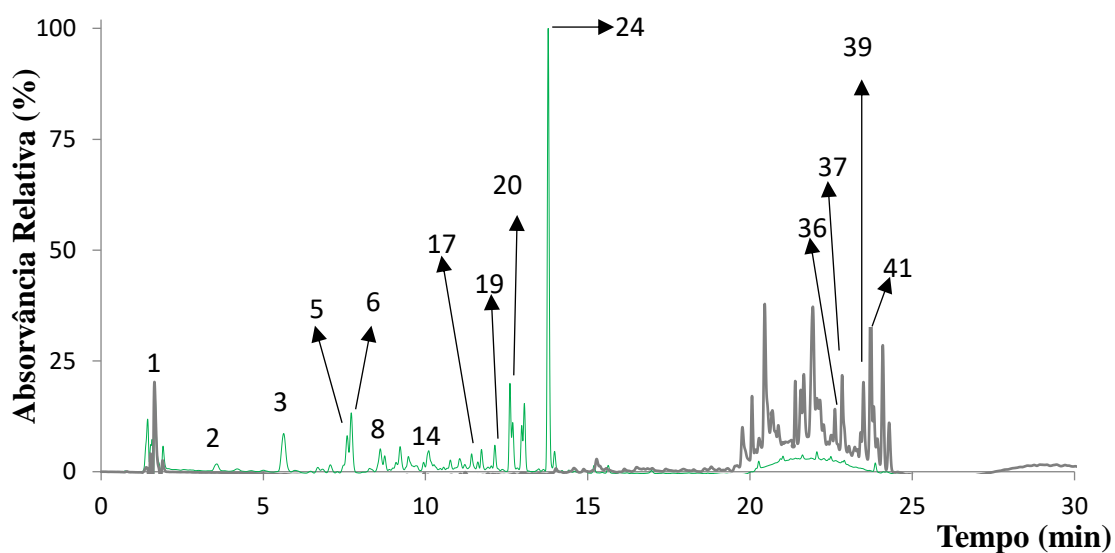


Gráfico I – Representação cromatográfica de cones (linha cinza) e parte vegetativa (linha verde) de lúpulo espontâneo a 280 nm.

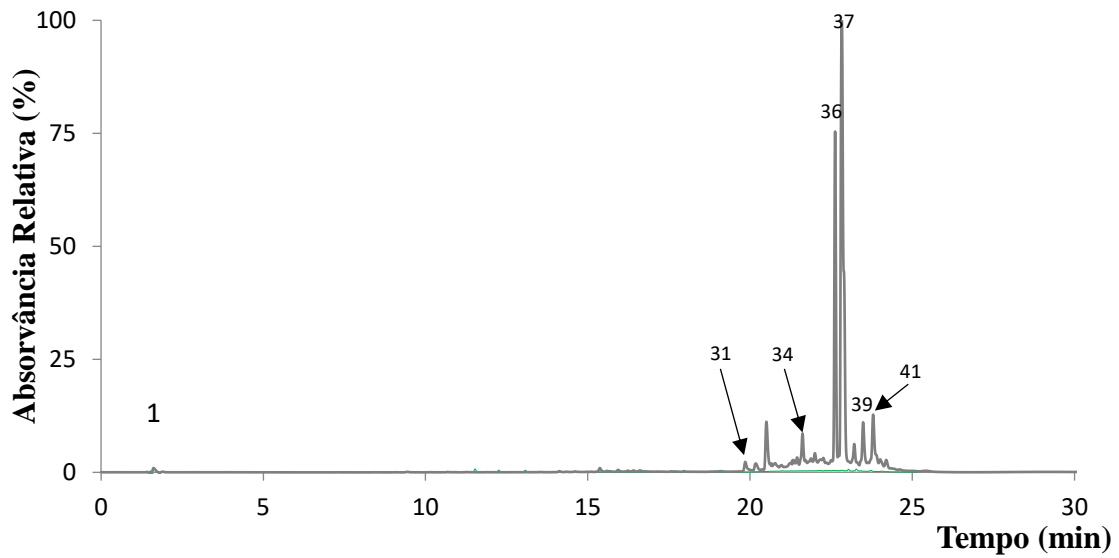


Gráfico II - Representação cromatográfica de cones (linha cinza) e parte vegetativa (linha verde) da variedade Polaris de lúpulo a 280 nm.

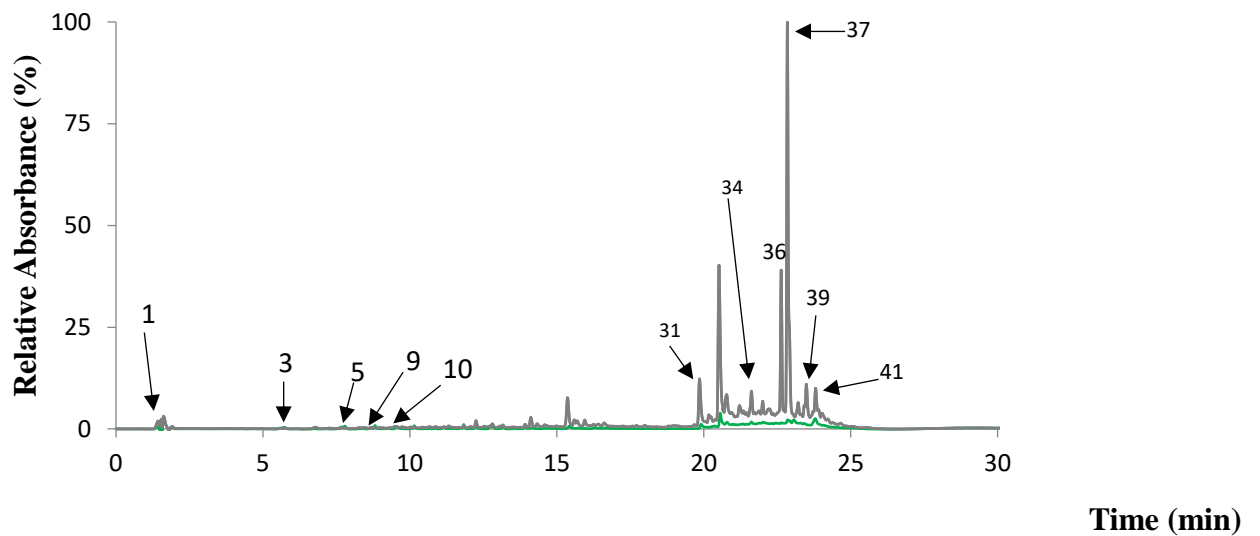


Gráfico III - Representação cromatográfica de cones (linha cinza) e parte vegetativa (linha verde) da variedade Nugget de lúpulo a 280 nm.

Tabela VII – Composição fitoquímica de extratos hidroalcoólicos do lúpulo determinados por UHPLC-DAD-ESI-MSⁿ.

NP	RT	UV _{max}	M-H-	MS ² Fragmentos Principais ESI-MS ⁿ (m/z)	Composto Provável	Nugget		Polaris		Espontâneo		Ref
						C	PV	C	PV	C	PV	
1	1,6	264	191	173 , 111	Ácido quinico	+	+	+	+	+	+	
2	3,6	315	315	269, 153 , 109	Ácido protocatecuico 4- <i>O</i> -glucosídeo	-	-	-	-	-	+	Tang, 2019
3	5,7	290sh, 324	353	191 , 179, 135	<i>cis</i> 3- <i>O</i> - Ácido cafeoilquinico	-	+	-	+	-	+	Tang, 2019
4	7,1	309	355	337, 209, 191 , 181	Ácido Ferúlico 4- <i>O</i> -glucosídeo	-	-	-	+	-	-	Tang, 2019
5	7,6	228, 307	337	191, 173, 163 , 119	Ácido coumaroilquinico (isómero 1)	-	+	-	-	-	+	
6	7,7	227, 310	337	191, 173, 163 , 119	Ácido coumaroilquinico (isómero 2)	-	+	-	+	-	+	Tang, 2019
7	8,3	290sh, 325	353	191 , (179, 135)	<i>trans</i> 5- <i>O</i> -Ácido cafeoilquinico	-	+	-	-	-	-	Sotto, 2018
8	8,6	290sh, 325	367	193 (173, 134)	3- <i>O</i> - Ácido feruloilquinico	-	+	-	+	-	+	Tang, 2019
9	8,8	290sh, 326	353	173 , 179, 191	4- <i>O</i> -Ácido cafeoilquinico	-	+	-	-	-	-	
10	9,3	271, 344, 355	595	475 , 385, 355, 341	Quercetina-3- <i>O</i> -glucosil-xilosídeo	-	+	-	-	-	-	Tang, 2019
11	9,5	273	427	337	NI	-	-	+	-	-	-	
12	9,6	274	447	401	NI	-	+	-	-	-	-	
13	10,0	312	337	191 , 163, 119	Ácido coumaroilquinico (isómero 3)	-	+	-	-	-	-	
14	10,5	275, 330	609	301	Quercetina- <i>O</i> -rutinósido (isómero 1)	-		-	-	-	+	
15	10,8	256, 266, 354	755	609, 591 , 489, 301	Quercetina-3-rutinosídeo-ramnosídeo	-	+	-	+	-	-	
					Kaempferol	-		-		-	-	
16	11,4	265, 346	739	593, 575 , 285, 284	3- <i>O</i> -(2'' - ramnosilgalactosídeo) 7- <i>O</i> -ramnosídeo		+		+			Tang, 2019

17	11,8	256, 266, 354	609	301	Quercetina- <i>O</i> -rutinosídeo (isómero 3)	+	+	-	-	-	+	Magalhaes,2010
18	12,1	256, 264, 352	593	429, (301) 285, 284	Kaempferol-3-rutinosídeo (isómero 1)	-	-	-	+	-	-	Magalhaes,2010
19	12,1	256, 264, 352	463	301, (179)	Quercetina-3-hexosídeo	+	+	-	-	-	+	Magalhaes,2010
20	12,6	265, 345	593	285, 284	Kaempferol-3-rutinosídeo (isómero 2)	-	+	-	-	-	+	
21	12,8	256, 265, 360	549	505, (387, 355, 329, 285)	Quercetina 3- <i>O</i> - (6"-malonil-glucosídeo)	+	+	-	-	-	+	Tang, 2019
22	13,0	265, 347	679	635, 499,	Crioseriol 7- <i>O</i> - (6"-malonil-apiosil-glucosídeo)	-	-	-	+	-	+	Tang, 2019
23	13,1	265, 347	447	327, 284, 285	Kaempferol-3-hexosídeo	+	+	-	-	-	+	Magalhaes,2010
24	13,8	265, 346	533	489, 329, 285	Derivado de Kaempferol-3-acetilhexosídeo	+	+	-	+	-	+	Magalhaes,2010
25	14,0	247	379	297	NI	+	+	+	-	-	-	
26	15,2	246, 270	393	267	NI	+	+	+	+	+	-	
27	15,7	259	377	359, 308, 280, 221, 125	NI	+	-	+	-	-	-	
28	16,1	248, 262	409	251	NI	+	+	-	+	-	-	
29	16,5	267	251	224, 207, 179, 125, 151, 107	NI	-	-	-	+	-	-	
30	19,7	261	363	345, 319, 267, 249, 209	NI	+	+	+	-	+	-	
31	20,0	256, 329	317	248, 180	Cohulupona	+	-	+	+	-	-	Hsu, 2019
32	20,5	261, 275	377	359, 281, 275, 263, 251, 223	NI	+	+	+	-	+	-	
33	21,2	274	375	ND	NI	+	-	-	-	-	-	
34	21,6	366	353	247, 233, 119	Xanthohumol	+	+	+	-	-	-	
35	22,0	282	377	359, 208, 281, 263, 238	NI	-	-	+	-	-	-	

36	22,6	283, 321	347	278	Cohumulona	+	-	+	+	+	-	Hofte, 1998 Magalhaes, 2010
37	22,8	283, 321	361	343, 292	Humulona	+	+	+	+	+	-	Hofte, 1998 Magalhaes, 2010
38	23,2	283	375	306	Adprehumulona/Prehumulona	-	-	+	-	-	-	Hsu, 2019
39	23,5	275, 331	399	330, 287 , 275, 262, 219, 194	Colupulona	+	-	+	-	+	-	Hofte, 1998 Magalhaes, 2010
40	23,7	282	495	477, 358, 325, 301, 289	NI	-	+	-	-	-	-	
41	23,8	275, 330	413	369, 344, 301 , 289, 276, 233	Lupulona	+	-	+	+	+	-	Magalhaes, 2010
42	24,0	285	513	ND	NI	+	-	-	-	+	-	
43	24,3	281	429	411, 360 , 333, 291	NI	-	-	-	+	+	-	

C- Extrato de Cones; PV- Extrato de Partes Vegetativas; NP- Número do pico representados nos Gráficos I, II e III; ND- Não determinado; NI- Não identificado; TR- Tempo de retenção; + - Presença; - - Ausência

Na globalidade das amostras, dos quarenta e três compostos detetados, trinta foram identificados, sendo cinco identificados como alfa e beta ácidos, 10 ácidos fenólicos e quinze flavonóides. Pela análise dos cromatogramas, os extratos obtidos a partir dos cones de lúpulo são mais ricos em compostos fenólicos que os obtidos a partir das partes vegetativas.

Relativamente ao composto que elui no pico 1, com um ião pseudomolecular a 191 m/z , este foi identificado como sendo o ácido quínico [Peso Molecular (PM) de 192], tendo em conta as suas características de tempo de retenção, e espectro de UV; foi identificado em todos os extratos (Tabela VII).

Os ácidos fenólicos como o ácido coumaroilquínico, protocatecuico glucosídeo, isómeros do ácido cafeoilquínico, que eluem até ao tempo 8,8 minutos, foram identificados maioritariamente nas partes vegetativas do lúpulo e sobretudo na variedade Nugget, sendo que a maioria deles já tinham sido identificada em plantas de lúpulo (Di Sotto et al., 2018; Tang et al., 2019) .

O pico identificado como 31, com um ião pseudomolecular a 317 m/z , foi identificado como um beta-ácido, a cohulupona (PM de 318), presente nas duas variedades de lúpulo à semelhança dos compostos que eluem nos picos identificados como 39 (colupulona) e o pico 41 (lupulona). Já os alfa-ácidos cohumulona (PM 348) e humulona (M-H- 361) eluem nos picos 36 e 37, respetivamente, e estão presentes na maioria dos extratos. À semelhança do que acontece no presente estudo, vários alfa e beta ácidos foram identificados anteriormente em extratos de lúpulo (Hofte et al., 1998; Magalhães et al., 2010)

O pico 34, com um ião pseudomolecular a 353 m/z , foi identificado como se tratando do flavonóide xanthohumol (PM 354), presente nos extratos hidroalcoólicos de cones e partes vegetativas da variedade Nugget e, de cones da variedade Polaris. Ainda, se tratando de flavonóides, foram identificados os compostos referentes aos picos, 10, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 e 24. O pico 24, com um ião pseudomolecular a 533 m/z , não foi identificado, no entanto sugere-se que se trata de um flavonóide derivado de

Kaempferol-3-acetilhexosídeo (PM 534). Encontra-se presente sobretudo nos extratos de partes vegetativas do lúpulo espontâneo, mas também nos extratos de cones e partes vegetativas da variedade Nugget e de partes vegetativas da variedade Polaris e. Os flavonóides foram os compostos maioritariamente identificados nos extratos hidroalcoólicos do lúpulo, sobretudo na variedade Nugget. Relativamente ao lúpulo espontâneo, também foram identificados compostos flavonóides nas partes vegetativas, concretamente glicosídeos de quercetina, kaempferol e crioseriol. Estes compostos foram descritos anteriormente para outros extratos do lúpulo (Magalhães et al., 2010; Tang et al., 2019).

5.1. Avaliação da estabilidade da formulação em gel – Teste de estabilidade preliminar

5.1.1. Análise organolética

A avaliação das características organoléticas, é a forma mais acessível para avaliar a qualidade de uma amostra. A cor e o cheiro são indicativos do estado de conservação da preparação, uma vez que uma mudança na cor ou no cheiro indicam alteração no estado de conservação (Nogueira Prista et al., 1995). Logo, as formulações foram avaliadas quanto a cor, cheiro e aspeto geral.

A análise organolética realizada sobre as formulações decorreu após a sua preparação, estando os resultados obtidos representados na tabela VIII. Estes resultados também são representativos de uma análise após 7 dias, após 14 dia e ao final de 30 dias. Ou seja, relativamente a cor, ao cheiro e ao aspeto, não houve quais alterações num período de 30 dias.

Tabela VIII – Análise organolética dos géis 0, 7, 14 e 30 dias após preparação.

Caraterística	Cor	Cheiro	Aspeto
Gel			
Base	Transparente	Sem cheiro	Homogéneo
EV 1,25%	Transparente	Sem cheiro	Homogéneo
EV 2,5%	Transparente	Sem cheiro	Homogéneo
EV 5%	Transparente	Sem cheiro	Homogéneo
EF 1,25%	Transparente	Sem cheiro	Homogéneo

EF 2,5%	Amarelo (ligeiro)	Cheiro característico da Flor	Homogéneo
EF 5%	Amarelo	Cheiro característico da flor	Homogéneo
NV 1,25%	Transparente	Sem cheiro	Homogéneo
NV 2,5%	Transparente	Sem cheiro	Homogéneo
NV 5%	Transparente	Sem cheiro	Homogéneo
NF 1,25%	Transparente	Sem cheiro	Homogéneo
NF 2,5%	Amarelo (ligeiro)	Cheiro característico da flor	Homogéneo
NF 5%	Amarelo	Cheiro característico da flor	Homogéneo
PV 1,25%	Transparente	Sem cheiro	Homogéneo
PV 2,5%	Transparente	Sem cheiro	Homogéneo
PV 5%	Transparente	Sem cheiro	Homogéneo
PF 1,25%	Transparente	Sem cheiro	Homogéneo
PF 2,5%	Amarelo (ligeiro)	Cheiro característico da flor	Homogéneo
PF 5%	Amarelo	Cheiro característico da flor	Homogéneo

E.F- extrato hidroalcoólico de cones de lúpulo espontâneo; E.V- extrato hidroalcoólico de partes vegetativas de lúpulo espontâneo; N.F- extrato hidroalcoólico de cones de nugget; N.V- extrato hidroalcoólico de partes vegetativas de nugget; P.F- extrato hidroalcoólico de cones de polaris; P.V- extrato hidroalcoólico de partes vegetativas de polaris.

Pelo que se pode verificar através dos resultados obtidos na tabela VIII, após a preparação das amostras e com a adição das diferentes concentrações dos diferentes extratos da planta do lúpulo, não apresentaram grandes diferenças nas características organolépticas, comparado com a formulação em gel base. A homogeneidade das amostras manteve-se igual em todos os géis. Relativamente à cor e ao cheiro verificou-se pequenas alterações quando se adicionou 2,5% e 5% dos extratos do cone das diferentes variedades da planta, alterando ligeiramente o cheiro e a cor com 2,5% de extrato dos cones (flor) e uma alteração notória, quando se adicionou 5% dos extratos dos cones dos diferentes extratos da planta de lúpulo.

As inflorescências femininas, produzem um pó amarelo a que podemos chamar de lupulina (Karabin et al., 2014; Miranda, 2015). As alterações referentes a cor e ao odor pode estar relacionada com a lupulina que se encontra presente nos cones da planta, uma vez que estas alterações só se apresentaram na adição dos extratos dos cones do lúpulo quando adicionados em concentrações superiores.

5.1.2. Medição do pH

É importante definir o pH de uma formulação destinada a aplicação cutânea, uma vez que cada produto deve apresentar um pH compatível com a região de aplicação. O pH natural da pele é determinado pelas secreções das glândulas sudoríparas e sebáceas, além da produção do ácido lático, que leva a formação de um filme protetor hidrolipídico sobre toda a superfície cutânea. A pele contém um pH medio de 5,5, embora este possa variar um pouco dependendo da área do corpo (Tichota et al., 2014).

A determinação do pH foi efetuada sobre todas as amostras, no momento após a preparação das formulações em gel com as diferentes concentrações de extratos das diferentes amostras de lúpulo, após 3, 7 e 14 dias. Os resultados obtidos estão representados na tabela XII em anexo.

As formulações mantiveram um pH ácido desde o início da formulação até aos 14 dias após a preparação das mesmas. Os valores de pH variaram de 5,9 a 6,2. Segundo Lucero et al., 1994, um valor de pH de 4,5 a 6, é o valor recomendado para aplicações cutâneas, de modo a evitar o risco de irritações da pele (Lucero et al., 1994). Deste modo, uma vez que o pH das formulações ultrapassa a faixa de pH recomendado para aplicações cutâneas, as formulações preparadas não são adequadas para aplicação cutânea, devendo pensar-se num ajuste de pH da formulação.

Neste sentido, o pH da formulação base não alterou muito com a incorporação dos extratos das diferentes variedades do lúpulo. Posto isto, e uma vez que na formulação do gel base foi necessário acertar o pH igual a 6, com um acerto de um pH inferior a 6, talvez as formulações passem a apresentar uma escala de pH dentro dos valores aceitáveis para aplicações cutâneas, de modo a evitar o risco de irritações da pele.

5.1.3. Textura (firmeza, consistência, coesividade e o índice de viscosidade)

A avaliação dos parâmetros de textura de formulações semissólidas fornece informações sobre suas propriedades mecânicas (Tichota et al., 2014).

Nos gráficos (IV, V, VI, VII, VIII, IX, X) abaixo, estão representados os resultados relativamente aos parâmetros da textura: firmeza, consistência, coesividade e índice de viscosidade das diferentes formulações.

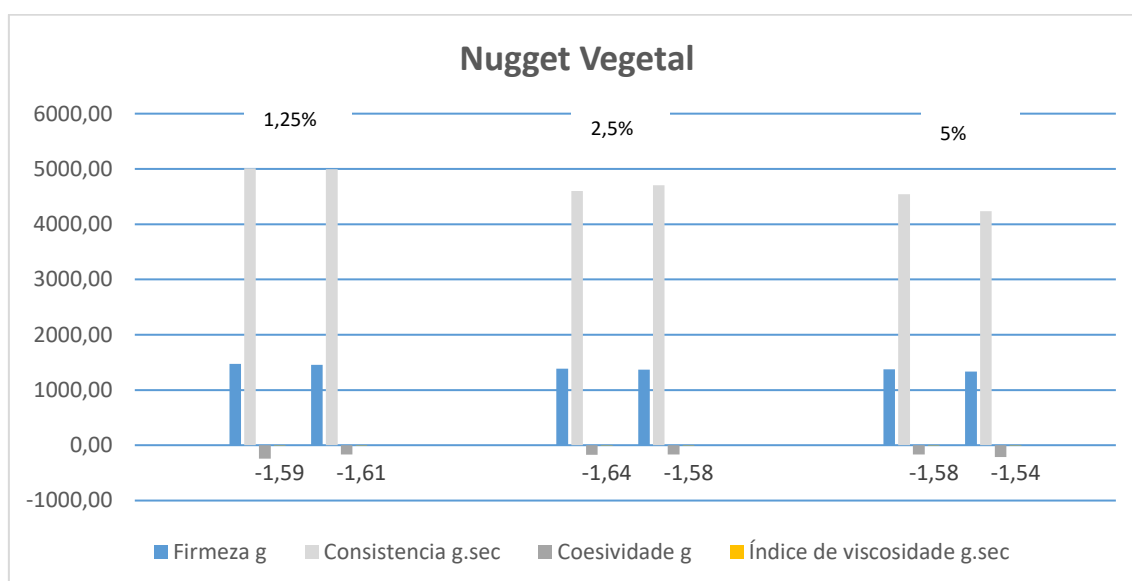


Gráfico IV –Firmeza, consistência, coesividade e índice de viscosidade dos géis com diferentes concentrações (1,25%, 2,5% e 5%) de extrato hidroalcoólico de partes vegetativas da variedade Nugget de lúpulo.

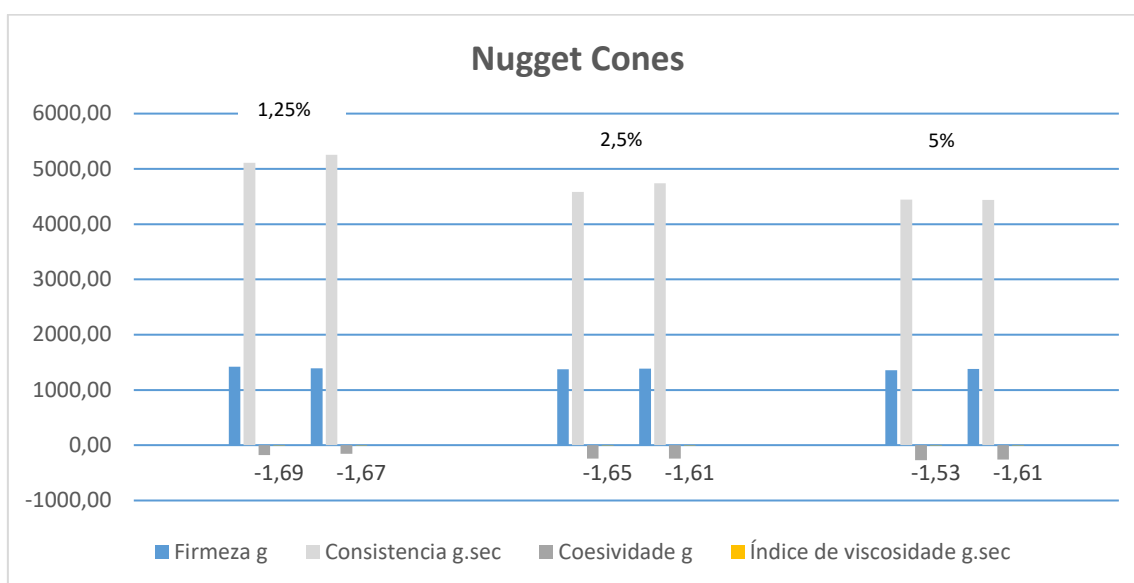


Gráfico V – Firmeza, consistência, coesividade e índice de viscosidade dos géis com diferentes concentrações (1,25%, 2,5% e 5%) de extrato hidroalcoólico dos cones da variedade Nugget de lúpulo.

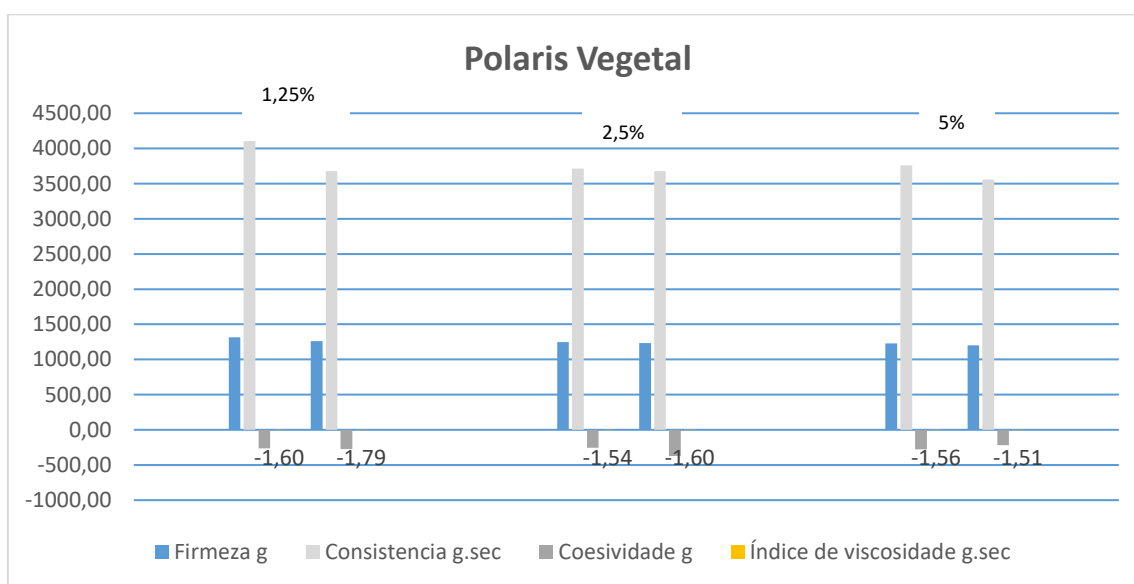


Gráfico VI – Firmeza, consistência, coesividade e índice de viscosidade dos géis com diferentes concentrações (1,25%, 2,5% e 5%) de extrato hidroalcoólico de partes vegetativas da variedade Polaris de lúpulo.

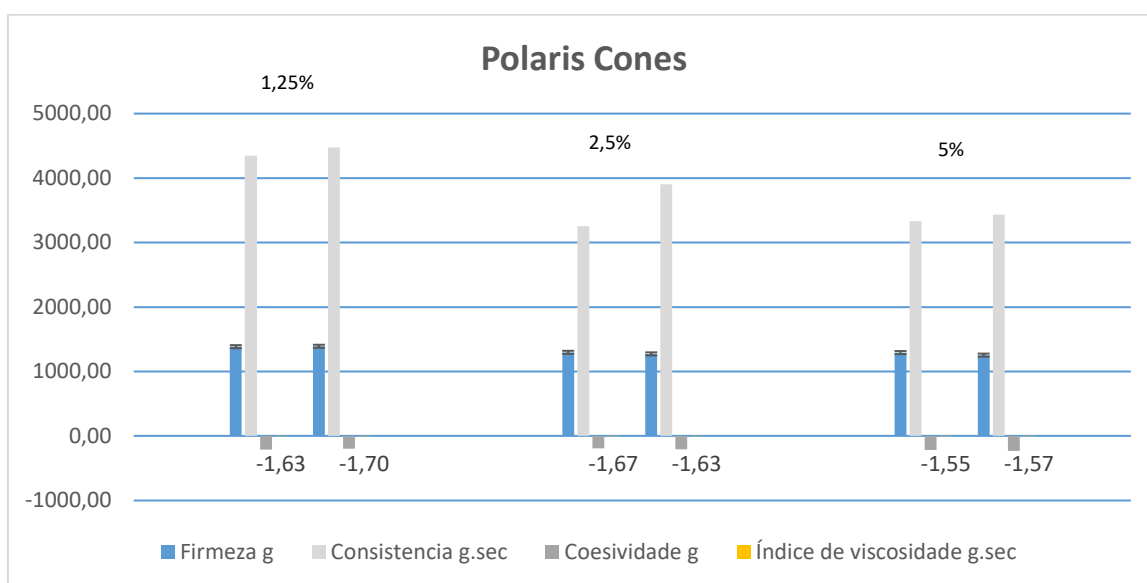


Gráfico VII – Firmeza, consistência, coesividade e índice de viscosidade dos géis com diferentes concentrações (1,25%, 2,5% e 5%) de extrato hidroalcoólico dos cones da variedade Polaris de lúpulo.

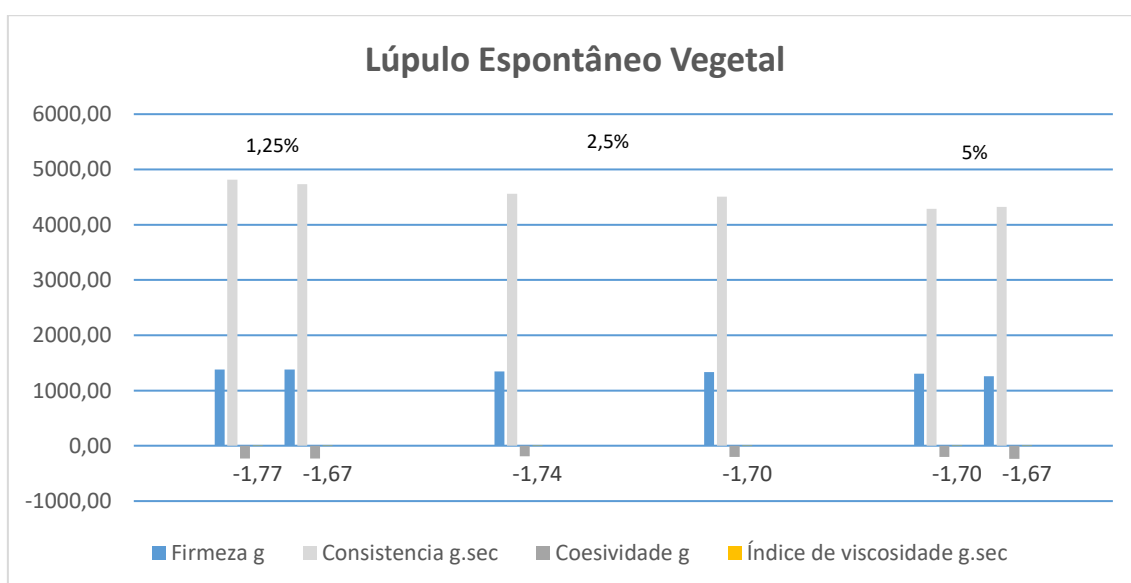


Gráfico VIII – Firmeza, consistência, coesividade e índice de viscosidade dos géis com diferentes concentrações (1,25%, 2,5% e 5%) de extrato hidroalcoólico de partes vegetativas de lúpulo espontâneo.

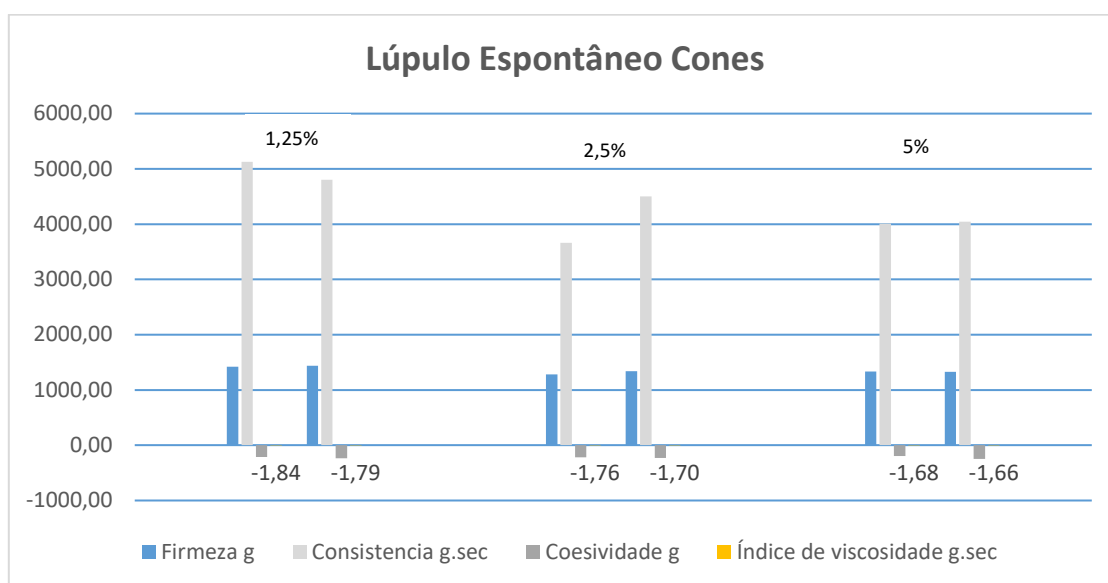


Gráfico IX – Firmeza, consistência, coesividade e índice de viscosidade dos géis com diferentes concentrações (1,25%, 2,5% e 5%) de extrato hidroalcoólico dos cones de lúpulo espontâneo.

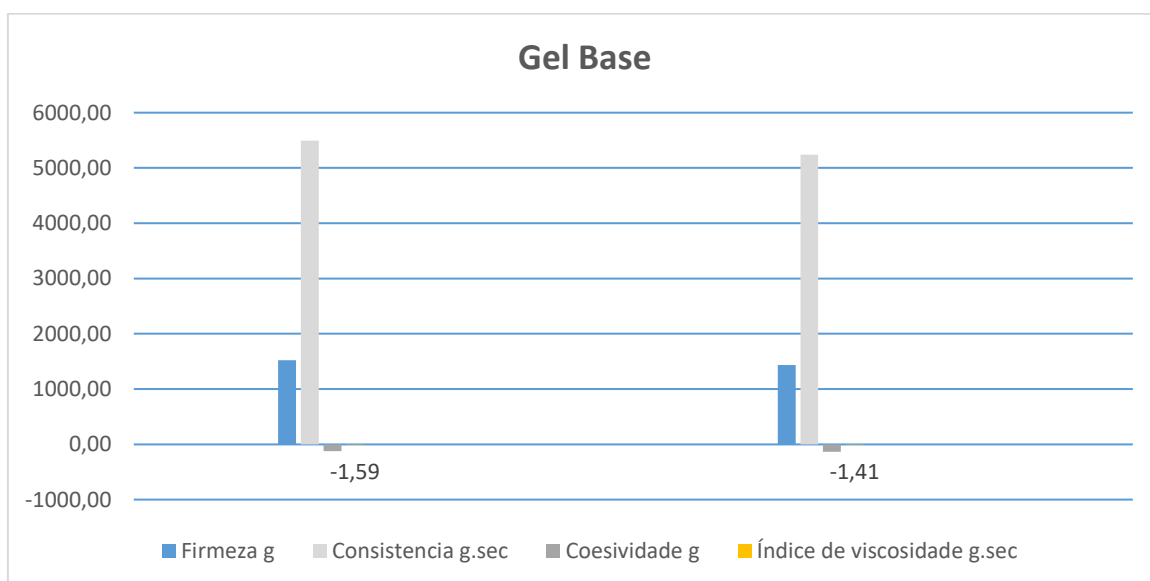


Gráfico X – Firmeza, consistência, coesividade e índice de viscosidade do gel base.

De acordo com Tichota (Tichota et al., 2014) a firmeza está relacionada com a facilidade de aplicação de um produto na pele. Através da análise dos gráficos, os valores

de firmeza para o gel base em média corresponde a $1478 \pm 43,535$ g, enquanto que os valores das formulações com os extratos variam de 1110 g a 1487 g. Pode-se também observar que a firmeza das formulações não aumenta em função do aumento da concentração dos extratos, pelo que as formulações com 1,25% de extrato manifestaram maior valor de firmeza do que as formulações que contêm 5% de extrato.

Tendo por base a análise dos gráficos na mesma variedade da planta do lúpulo, a consistência tende a diminuir consoante o aumento da concentração de extrato das formulações. Comparando a consistência do gel base com as formulações incorporadas com os extratos do lúpulo, observou-se uma diminuição da consistência. Pois a consistência do gel base em média corresponde a $5366 \pm 126,105$ g/sec enquanto que a consistência das formulações dos extratos já é menor sendo o valor mais alto 5256,09 g/sec.

A coesividade indica o quanto a estrutura do gel permaneceu intacta após a primeira compressão (Ovos et al., 2005). Relativamente à coesividade das formulações, a base gel tem uma coesividade maior em comparação com as outras formulações, tendo uma média igual a $-129 \pm 3,885$ g, o que se leva a crer que com a adição dos extratos a coesividade tende a diminuir. No que se refere a adição das diferentes concentrações pode se observar que a coesividade quase não sofre alteração, mantendo uma média praticamente igual.

Relativamente ao índice de viscosidade das formulações contendo extratos, dentro das variedades, este aumenta consoante aumenta a concentração de extrato das formulações. O gel base tem um índice de viscosidade maior, $-1,5 \pm 0,09$, comparativamente as formulações com os extratos incorporados, de acordo com a análise feita através dos gráficos.

5.1.4. Vibração Mecânica

A vibração durante o transporte pode afetar a estabilidade das formulações, causando separação das fases das emulsões, solidificação das suspensões, entre outros (ANVISA, 2005), pelo que é fundamental avaliar estes parâmetros.

O teste de vibração mecânica não revelou quaisquer alterações nas amostras, mantendo todas o mesmo aspeto homogéneo inicial sem separação de fases, como se pode observar no exemplo da figura 16.



Figura 16 - Resultado do teste de vibração mecânica.

5.1.5. Teste de Centrifugação

A centrifugação gera stresse na preparação porque são criadas condições que simulam um aumento da força da gravidade, o que permite antecipar possíveis alterações de estabilidade (Moreira de Oliveira, 2009). Estas alterações podem ser observadas sob a forma de precipitados, ocorrência de separação de fases, formação de sedimentos compactos, entre outros (Moreira de Oliveira, 2009).

No final dos dois ciclos de centrifugação, nenhuma das formulações em gel apresentou instabilidade física, como separação de fases ou outra alteração, como se pode verificar na figura 17. Manifestaram no final do teste, o mesmo aspeto homogéneo verificado logo após a sua preparação.



Figura 17 – Resultado do teste de centrifugação.

5.1.6. Teste Espectrofotométrico

As formulações foram submetidas a uma análise espectrofotométrica, no sentido de verificar a sua estabilidade química. Os resultados estão representados nos gráficos (XI, XII, XIII, XIV, XV, XVI e XVII) abaixo.

A formulação base e as formulações com 1,25% de extrato de lúpulo incorporado, apresentaram um espectro semelhante. Já as formulações com 2,5% e 5% de extrato de lúpulo incorporado, apresentaram um espectro maior. Pelas extrações hidroalcoólicas dos cones e partes vegetativas das amostras de lúpulo, obtiveram-se extratos líquidos de cor amarela e verde, respetivamente. Visto que que as formulações testadas, com maior concentração de extrato de lúpulo apresentaram uma absorvância maior, estes resultados podem estar associados a pigmentação dos extratos.

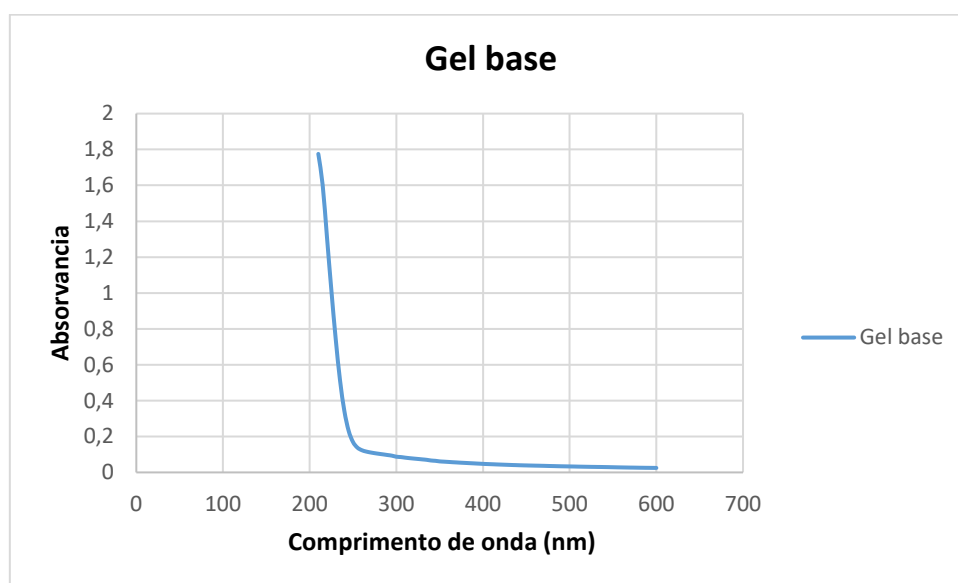


Gráfico XI – Resultados da análise espectrofotométrica do gel base.

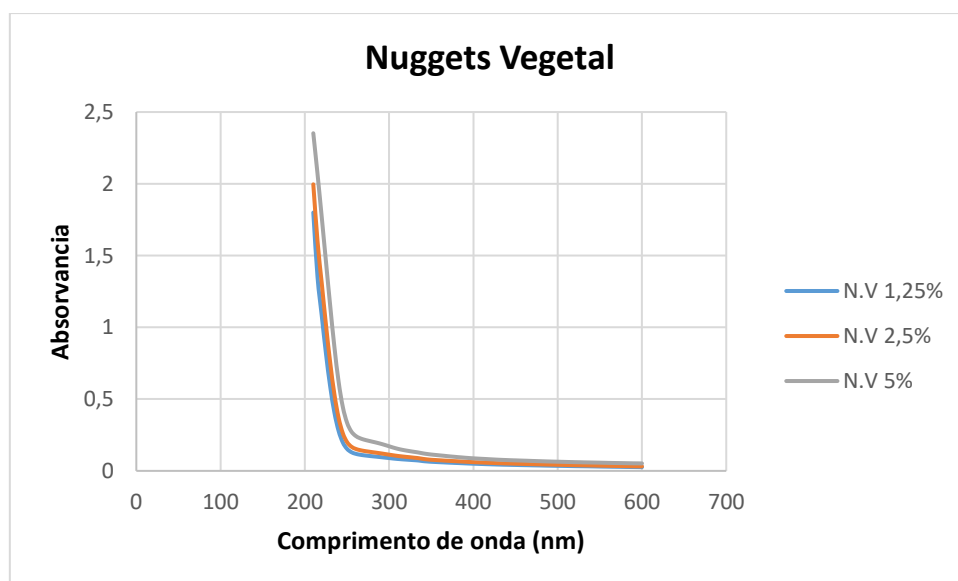


Gráfico XII – Resultados da análise espectrofotométrica de Nuggets vegetal.

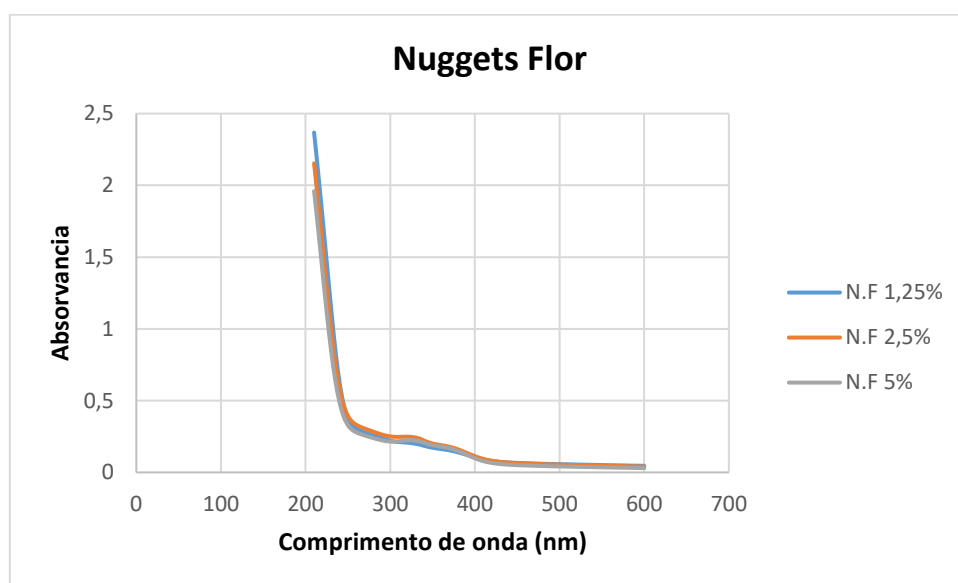


Gráfico XIII – Resultados da análise espectrofotométrica de Nuggets flor.

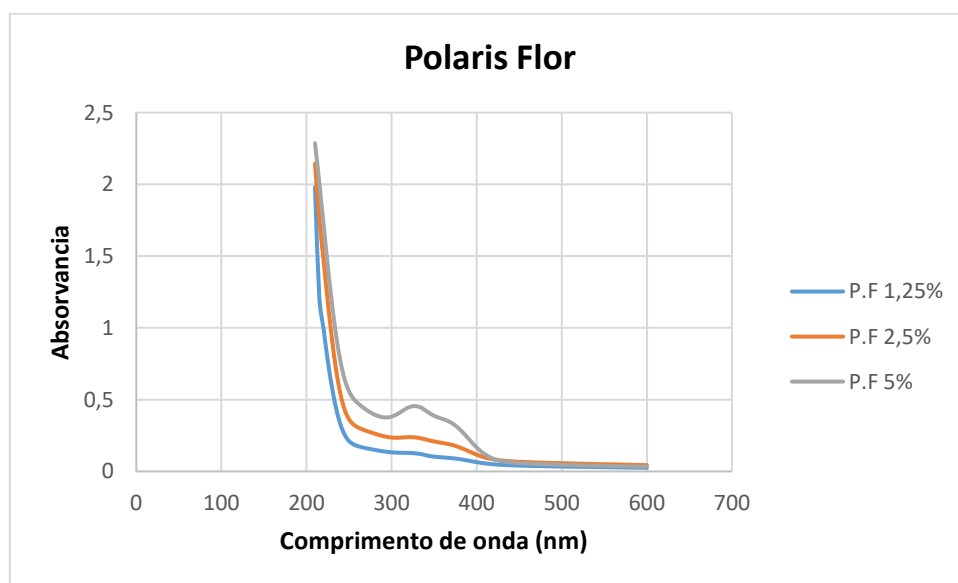


Gráfico XIV – Resultados da análise espectrofotométrica de Polaris Flor.

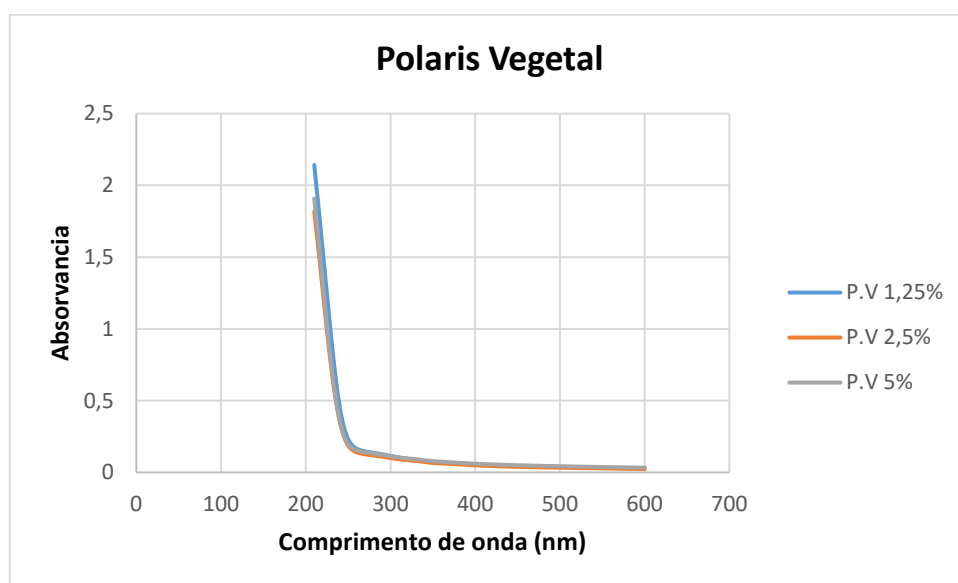


Gráfico XV – Resultados da análise espectrofotométrica de Polaris Vegetal.

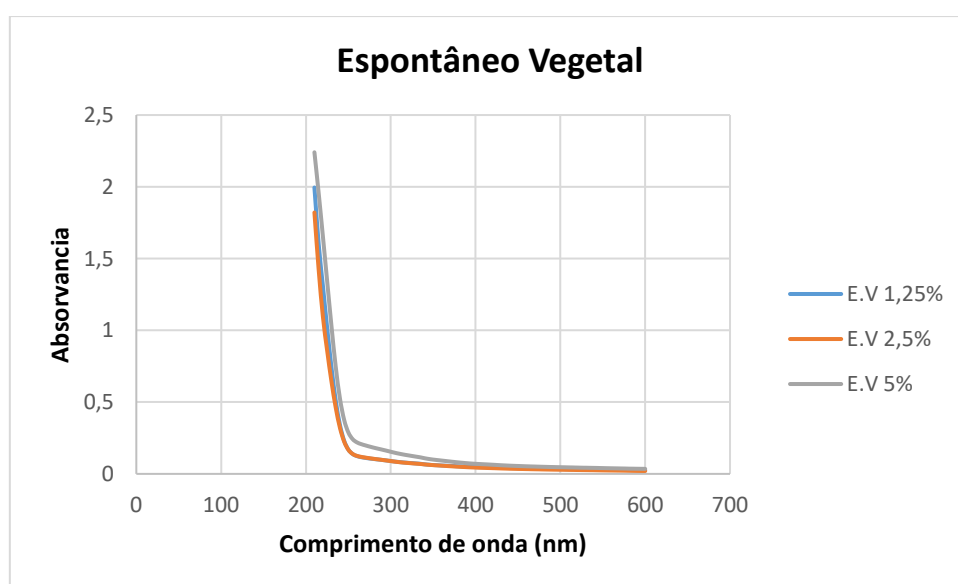


Gráfico XVI – Resultados da análise espectrofotométrica de lúpulo Espontâneo Vegetal.

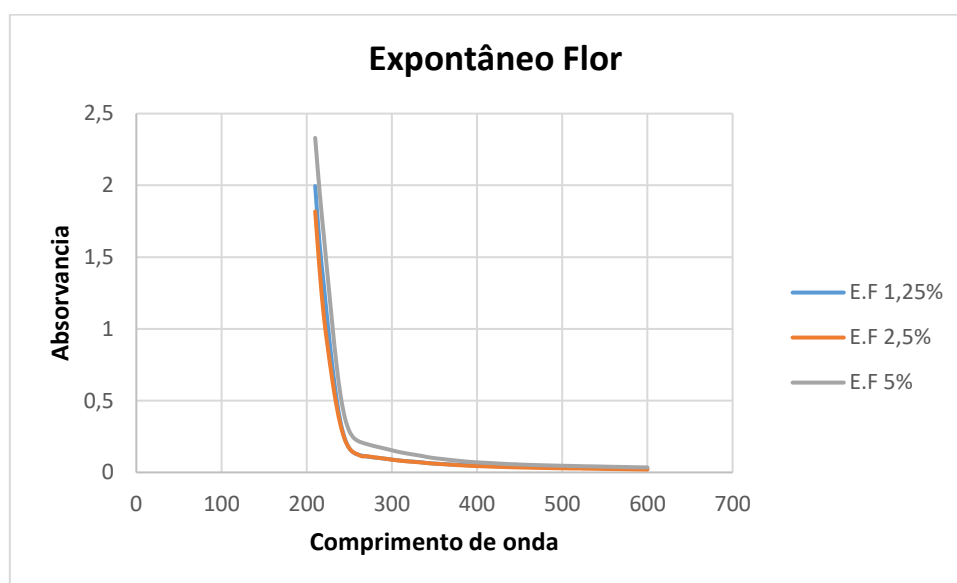


Gráfico XVII – Resultado da análise espectrofotométrica de lúpulo Espontâneo Flor.

5.1.7. Densidade

No caso de líquidos ou semissólidos a densidade pode indicar a incorporação de ar ou a perda de ingredientes voláteis (ANVISA, 2005). Os resultados obtidos estão representados na tabela IX.

Tabela IX – Resultados da densidade obtidos após a preparação das formulações, 3 e 7 dias depois.

	Densidade (Kg/m ³)		
	t=0	t=3 dias	t=7 dias
Gel base	1,08±0,00	1,08±0,00	1,08±0,00
NF 1,25%	1,11±0,00	1,11±0,00	1,14±0,03
NF 2,5%	1,11±0,00	1,095±0,015	1,11±0,00
NF 5%	1,08±0,00	1,095±0,015	1,08±0,00
NV 1,25%	1,11±0,00	1,11±0,00	1,08±0,00
NV 2,5%	1,11±0,00	1,095±0,015	1,11±0,00
NV 5%	1,08±0,00	1,095±0,015	1,08±0,00
EF 1,25%	1,11±0,00	1,11±0,00	1,08±0,00

EF 2,5%	1,11±0,00	1,11±0,00	1,11±0,00
EF 5%	1,08±0,00	1,08±0,00	1,11±0,00
EV 1,25%	1,115±0,005	1,11±0,00	1,11±0,00
EV 2,5%	1,08±0,00	1,095±0,015	1,08±0,00
EV 5%	1,08±0,00	1,08±0,00	1,08±0,00
PF 1,25%	1,12±0,00	1,12±0,00	1,115±0,005
PF 2,5%	1,11±0,00	1,08±0,00	1,08±0,00
PF 5%	1,08±0,00	1,11±0,00	1,08±0,00
PV 1,25%	1,11±0,00	1,11±0,00	1,117±0,00
PV 2,5%	1,11±0,00	1,11±0,00	1,11±0,00
PV 5%	1,08±0,00	1,08±0,00	1,095±0,015

E.F- extrato hidroalcoólico de cones de lúpulo espontâneo; E.V- extrato hidroalcoólico de partes vegetativas de lúpulo espontâneo; N.F- extrato hidroalcoólico de cones de nugget; N.V- extrato hidroalcoólico de partes vegetativas de nugget; P.F- extrato hidroalcoólico de cones de polaris; P.V- extrato hidroalcoólico de partes vegetativas de polaris.

Quanto à densidade, as formulações apresentam uma densidade aparente entre $1,08\pm 0,00 \text{ Kg/m}^{-3}$ e $1,14\pm 0,03 \text{ Kg/m}^{-3}$. A formulação gel base, apresentou uma densidade aparente de $1,08\pm 0,00 \text{ Kg/m}^{-3}$. Portanto a densidade das formulações contendo extrato não varia muito da densidade da formulação base.

5.2. Avaliação da estabilidade da formulação em gel – Teste de estabilidade acelerada

5.2.1. Teste de Humidade relativa

O teste de humidade relativa teve a duração de 30 dias, no qual as amostras foram submetidas a diferentes temperaturas e percentagem de humidade relativa. Ao fim de 30 dias, as características organolépticas de cada formulação (cor, cheiro, aspeto), separação de fases e o valor do pH, foram analisadas.

Relativamente às características organolépticas, não se registaram alterações quanto a cor, cheiro e aspeto, mantendo as formulações o mesmo aspeto homogêneo, a mesma cor e o mesmo odor comparativamente com as formulações iniciais. Também não se registou separação de fases das amostras. Os valores do pH estão representados na tabela XIII em

anexo pode-se concluir que não se registaram alterações relativamente ao pH das formulações mantendo um pH entre $5,93 \pm 0,047$ e $6,16 \pm 0,047$.

5.2.2. Teste de Luz

A luz ultravioleta junto com o oxigénio leva a formação de radicais livres. A mudança de cor e do odor da formulação, são indicativos de ocorrência de oxidação que se traduz na degradação dos ingredientes da formulação (ANVISA, 2005).

No teste de luz as amostras duplicadas de cada preparação foram submetidas a condições extremas de luminosidade com recurso a uma lâmpada daylighth durante 30 dias. Após 15 dias em que as amostras tiveram submetidas a condições extremas de luminosidade, registraram-se uma pequena desidratação das mesmas. No final de 30 dias, observou-se desidratação das preparações, como mostra a figura 16. Relativamente as características organoléticas, não houve qualquer alteração na cor e no odor das amostras. Em contrapartida, houve alteração no aspeto, pois com a desidratação das mesmas, as amostras revelaram um aspeto mais pegajoso e menos húmido.

Pode-se constatar que estas alterações não estão relacionadas com a adição das diferentes concentrações dos extratos nem das diferentes variedades da planta do lúpulo, uma vez que o nível de desidratação não foi igual em todas as amostras duplicadas do mesmo extrato ou da mesma concentração. Como se observa na figura 16, por exemplo, para Polaris flor a 2,5%, a desidratação não é a mesma no gel 1 e no gel 2, sendo a desidratação maior no gel 1. Também se pode dizer o mesmo para Nuggets flor a 5%.

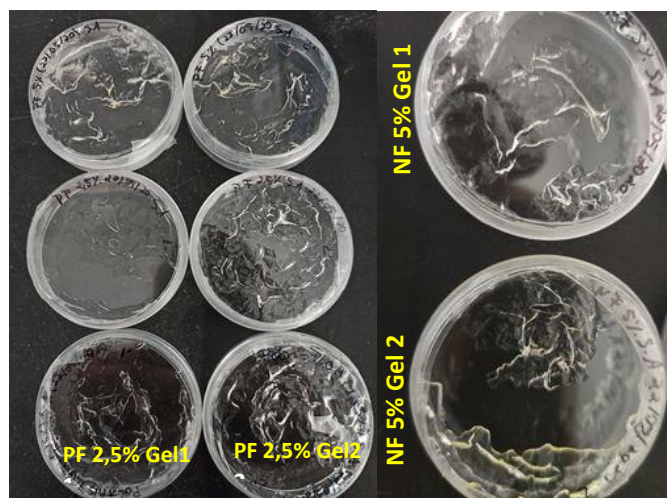


Figura 18 – Resultado do teste de luz.

5.2.3. Variação extrema da temperatura consecutiva

As amostras foram submetidas a condições extremas de temperatura congelamento/descongelamento. Ao fim dos ciclos de congelamento e descongelamento, as formulações foram analisadas quanto a cor, separação de fases, aspeto e odor. Não se observou alteração na cor, no aspeto e odor das formulações, nem a presença de separação de fases das amostras.

5.3. Atividade antimicrobiana e antifúngica

Em geral, todos os produtos que contêm água e compostos orgânicos ou inorgânicos, com condições físico-químicas adequadas, estão sujeitos a contaminação microbiana, justificando o facto destes produtos, carecer de proteção eficaz e adequada, contra a proliferação microbiana. Sistemas de preservação, intrínsecos ou extrínsecos, devem salvaguardar o produto da degradação microbiana, quer seja em sua embalagem fechada até ao uso, ou em recipiente aberto durante o uso.

A pele e as mucosas são protegidas contra microrganismos. No entanto, a presença de microrganismos em produtos cosméticos, podem aumentar o risco de infecção microbiana. Estudos, referenciam as estirpes *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans* entre os microrganismos mais frequentes encontrados em cosméticos (Halla *et al.*, 2018).

5.3.1. Atividade antibacteriana

Para avaliação da atividade antimicrobiana e antifúngica do óleo essencial de *Thymus zygis* subsp. *zygis*, recorreu-se a extração do mesmo por destilação a vapor onde se obteve um volume de 0,3mL do óleo essencial extraído, com um rendimento de extração de 0,375% (v/m).

Os resultados dos respetivos MIC e MBC de cada amostra, estão representados na tabela X.

Como se pode observar pela análise da tabela X, os extratos do lúpulo, nas concentrações testadas, não apresentaram atividade antimicrobiana contra as estirpes de bactérias utilizadas. Vários estudos descritos na bibliografia, defendem que o lúpulo possui propriedades antibacterianas e antifúngica (Bartmańska *et al.*, 2018), levando a concluir que os valores dos respetivos MIC e MBC, são superiores aos valores das concentrações testadas.

Tabela X – Atividade antibacteriana (MIC e MBC) dos extratos do lúpulo e do óleo essencial do *Thymus zygis* subsp. *Zygis*.

Amostras	Bactérias					
	<i>P. aeruginosa</i>		<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>	
	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC

<i>T. zygis</i> subsp. <i>zygis</i>	1,25%	1,25%	0,31%	0,31%	0,031%	0,031%
E.F	>10 mg/mL	>10 mg/mL	>10 mg/mL	>10 mg/mL	>10 mg/mL	>10 mg/mL
E.V	>10 mg/mL	>10 mg/mL	>10 mg/mL	>10 mg/mL	>10 mg/mL	>10 mg/mL
N.F	> 10 mg/mL	> 10 mg/mL	> 10 mg/mL	> 10 mg/mL	> 10 mg/mL	>10 mg/mL
N.V	> 10 mg/mL	> 10 mg/mL	> 10 mg/mL	> 10 mg/mL	> 10 mg/mL	> 10 mg/mL
P.F	> 10 mg/mL	> 10 mg/mL	> 10 mg/mL	> 10 mg/mL	> 10 mg/mL	> 10 mg/mL
P.V	> 10 mg/mL	> 10 mg/mL	> 10 mg/mL	> 10 mg/mL	> 10 mg/mL	> 10 mg/mL

E.F- extrato hidroalcoólico de cones de lúpulo espontâneo; E.V- extrato hidroalcoólico de partes vegetativas de lúpulo espontâneo; N.F- extrato hidroalcoólico de cones de nugget; N.V- extrato hidroalcoólico de partes vegetativas de nugget; P.F- extrato hidroalcoólico de cones de polaris; P.V- extrato hidroalcoólico de partes vegetativas de polaris.

O óleo essencial de *Thymus zygis* subsp. *zygis*, ao contrário das amostras do lúpulo, apresentou atividade antimicrobiana contra as três estirpes bacterianas testadas. No geral, e pela análise dos resultados apresentados na tabela X, das três estirpes de bactérias testadas, o OE de *Thymus zygis* subsp. *zygis* teve maior atividade antibacteriana contra bactérias Gram positivas, nomeadamente o *Staphylococcus aureus* que revelou ser o mais sensível, uma vez que o OE 0,031% foi capaz de inibir o seu crescimento. Em um estudo realizado por Afonso & Pereira, com decocções de *Thymus herba-baroma*, *Thymus pseudolanuginosus* e *Thymus caespitius*, o *Staphylococcus aureus* exibiu maior sensibilidade entre as estirpes testadas (Afonso & Pereira, 2020).

O OE de *Thymus zygis* subsp. *zygis*, apresentou maior valor de MIC para a *Pseudomonas aeruginosa*, sendo das estirpes bacterianas testadas a mais resistente, com um MIC igual a 1,25% do OE. Quanto à atividade antibacteriana para a *Escherichia coli*, apresentou um valor de MIC igual a 0,31%, confirmando assim atividade antimicrobiana do *Thymus zygis* subsp. *zygis* contra bactérias Gram negativas.

5.3.2. Atividade antifúngica

Para a avaliação da atividade antifúngica dos extratos das diferentes variedades do lúpulo e do *Thymus zygis* subsp. *zygis*, foi utilizado o método de difusão em disco em agar, usando a estirpe *Candida albicans*.

Como ocorrido na análise da atividade antimicrobiana, os extratos das duas variedades do lúpulo e do lúpulo espontâneo, não apresentaram atividade antifúngica contra a *Candida albicans*, nas concentrações testadas, como se pode observar na figura 19.

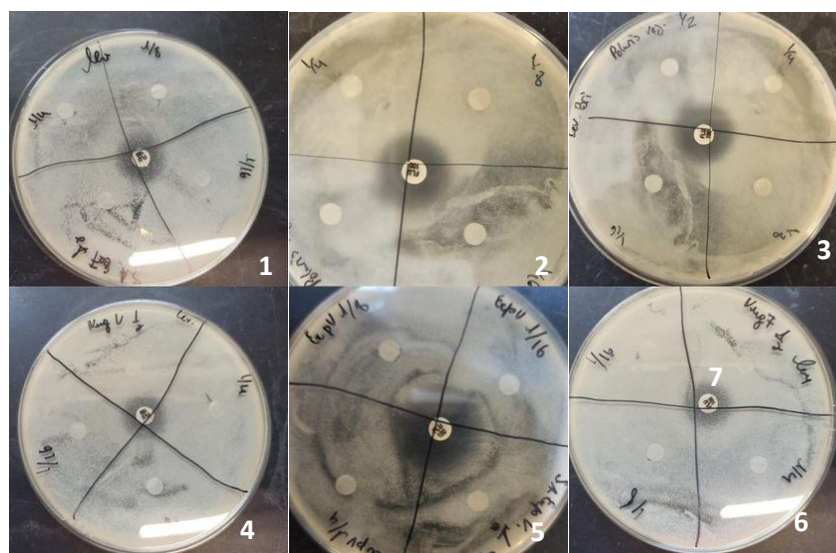


Figura 19 - Resultados da atividade antifúngica dos extratos do lúpulo com a *Candida albicans*. Halos de inibição formados para as diluições: 1/2; 1/4; 1/8; e 1/16 do extrato hidroalcoólico dos cones do lúpulo espontâneo (1), de partes vegetativas da variedade Polaris (2), de cones da variedade Polaris (3), de partes vegetativas da variedade Nugget (4), dos cones de Nugget (5), das partes vegetativas do lúpulo espontâneo (6), controlo (7).

Já o *Thymus zygis* subsp. *zygis*, apresentou atividade antifúngica contra a estirpe fúngica testada, *Candida albicans*. Mediu-se o halo de inibição e os valores se encontram representados na tabela XI.

Tabela XI – Resultado da atividade antifúngica do óleo essencial de *Thymus zygis* subsp. *zygis* para a *Candida albicans*

Concentrações de OE de <i>Thymus zygis</i> subsp. <i>zygis</i>	Halo de inibição (cm)
2,5%	0,95 cm
1,25%	0,6 cm
0,625%	0,2 cm
0,31%	0 cm
Fluconazol (Controlo)	Halo de inibição (cm)
100 µg	0,3 cm

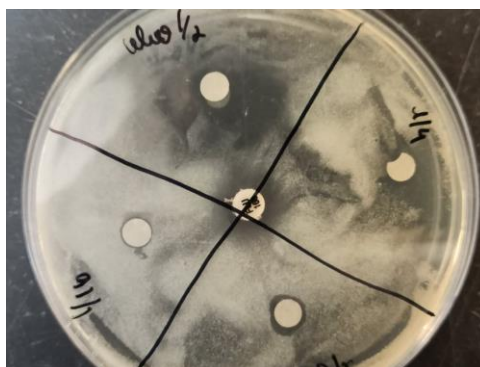


Figura 20 - Resultado do método de Difusão em disco em placa do óleo essencial de *Thymus zygis* subsp. *zygis*.

Através da análise dos resultados obtidos apresentados na tabela XI, a maior concentração do óleo essencial de *Thymus zygis* subsp. *zygis* testada levou à formação de um halo de inibição de 0,9 cm. Também se observou que o óleo essencial do *Thymus zygis* subsp. *zygis*, deixa de ter atividade antifúngica com 0,31% do OE. De acordo com estes resultados, pode-se confirmar que o óleo essencial de *Thymus zygis* subsp. *zygis* possui atividade antifúngica contra a *Candida albicans* tendo um halo de inibição três

Humulus lupulus L.: aplicação cosmética de extratos obtidos de cones e partes vegetativas

vezes maior que o controlo, na maior concentração testada 2,5%, e duas vezes maior com 1,25% do OE.

6. Conclusão

Atualmente a procura de produtos cosméticos de base natural é uma realidade, o que constitui um desafio para a indústria cosmética, no que respeita à produção e sobretudo à estabilidade. Neste sentido, com o objetivo de prever alterações físico-químicas e microbiológicas que podem ocorrer desde a fabricação de uma formulação cosmética, até o final do seu prazo de validade, o estudo da sua estabilidade apresenta-se como uma etapa determinante no desenvolvimento de uma formulação cosmética. Este estudo permite avaliar o desempenho, segurança e eficácia do produto cosmético e contribuir para a redução do seu tempo de desenvolvimento. Os testes de estabilidade orientam o desenvolvimento de formulações cosméticas, fornecendo informações para melhorias na preparação, no caso de se encontrarem manifestações de instabilidade e/ou incompatibilidade entre ingredientes (Bartmańska et al., 2018; Vieira et al., 2009).

De acordo com os resultados obtido no presente estudo, as formulações contendo extratos hidroalcoólicos de partes vegetativas e cones, das variedades Nugget e Polaris de lúpulo e de uma amostra de um lúpulo espontâneo, apresentaram um bom desempenho na avaliação da estabilidade físico-química das mesmas. Não se registrou separação de fases nos teste de centrifugação, vibração mecânica e nas condições simuladas de armazenamento a longo prazo, o que indica que as condições de transporte e os movimentos de vibração não modificam as formulações, assim como o armazenamento a longo prazo em diferentes condições de humidade e temperatura não alteram os estado físico das formulações. As características organolépticas permaneceram iguais desde o momento da preparação das formulações até o final de cada teste. As formulações apresentaram um pH ácido entre $5,93 \pm 0,047$ e $6,16 \pm 0,047$, com uma densidade aparente que variou entre $1,08 \pm 0,00 \text{ Kg/m}^{-3}$ e $1,14 \pm 0,03 \text{ Kg/m}^{-3}$, tendo a formulação base uma densidade aparente igual a $1,08 \pm 0,00 \text{ Kg/m}^{-3}$, próxima da densidade das formulações contendo extratos. No teste da avaliação da textura, a consistência das formulações diminuiu à medida que a concentração de extrato aumentava, podendo-se concluir que quanto maior a concentração de extrato menor a consistência. Já em relação a firmeza das formulações verificou-se que a firmeza das formulações não aumenta em função do

aumento da concentração dos extratos. No teste de luz, não se registaram alteração na cor e no cheiro das formulações, mas ao fim dos 30 dias do teste, houve desidratação das formulações.

Tendo em conta os resultados obtidos neste trabalho, a incorporação de extratos hidroalcoólicos de lúpulo em formulações cosméticas, neste caso géis com polímero de Carbopol, não altera a maioria das propriedades físico-químicas das formulações sujeitas a diferentes condições de temperatura e armazenamento a longo prazo, e também não altera as características organolépticas das formulações. Relativamente ao pH das formulações ($5,93 \pm 0,047$ e $6,16 \pm 0,047$), não se encontra na escala de pH aceite para aplicações tópicas. Talvez acerto no pH para um valor inferior a 6 na preparação do gel, possa ser uma solução, no entanto, esta hipótese carece de testes futuros.

Relativamente à atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos de lúpulo, verificou-se que estes não apresentaram atividade antibacteriana nem antifúngica contra as estirpes de bactérias e fungos testadas, nas concentrações usadas, o que não descarta a hipótese de possuírem atividade antimicrobiana, uma vez que a bibliografia descreve o lúpulo como uma planta com estas propriedades.

Por sua vez, o óleo essencial de *Thymus zygis* subsp. *zygis* apresentou atividade antibacteriana e antifúngica contra todas as estirpes testadas, o que justifica a inclusão do óleo essencial de *Thymus zygis* subsp. *zygis* na formulação, como conservante. Concretamente, apresentou valores de 0,31%, 0,031% e 1,25% (MIC e MBC) para *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*, respetivamente, e um halo entre 0,95 cm e 0,2 cm para as concentrações de 2,5% e 0,625%, respetivamente. O *S. aureus* exibiu maior sensibilidade enquanto que a *P. aeruginosa* exibiu maior resistência entre as estirpes testadas, com um MIC igual a 1,25%.

Quanto ao estudo do perfil fenólico de cones e partes vegetativas, das variedades Nugget e Polaris do lúpulo e do lúpulo espontâneo, dos quarenta e três compostos detetados, trinta foram identificados, tendo sido cinco identificados como ácidos alfa e beta, dez ácidos fenólicos e quinze flavonóides. Os compostos ácidos cohulupona, cohumulona, humulona e lupulona foram todos identificadas em extratos de cones e

partes vegetativas da variedade Polaris, sendo que a colupulona foi identificada apenas em extratos dos cones desta variedade. Em relação ao lúpulo espontâneo a parte vegetativa da planta, apresentou compostos flavonóides como a quercetina, kaempferol e crioseriol, nas suas formas glicosiladas. O isoxanthohumol, um prenilflavonóide com propriedades fito-estrogénicas, também foi identificado em extratos hidroalcoólicos de cones e partes vegetativas da variedade Nugget do lúpulo, e também em cones da variedade Polaris.

Ao efetuar o estudo do perfil fenólico dos diferentes extratos de cones e partes vegetativas das diferentes variedades e do lúpulo espontâneo, pretendeu-se verificar se as partes vegetativas da planta do lúpulo, que são descartadas durante a produção da cerveja, apresentam compostos com interesse para indústria cosmética, e outras. Com estes resultados, pode dizer-se que embora as partes vegetativas da planta do lúpulo sejam menos ricas em compostos fenólicos, possuem igualmente compostos importantes como é o isoxanthohumol, encontrado em partes vegetativas da variedade Nugget, assim como compostos flavonóides identificados nas partes vegetativas do lúpulo espontâneo.

Propõem-se, assim, um estudo mais exaustivo das partes vegetativas do lúpulo, que inclua a quantificação de compostos fenólicos conjuntamente com a otimização das condições de extração, na perspetiva de aproveitamento e valorização deste subproduto do lúpulo. Ainda, dever-se-ão realizar estudos de bioatividade utilizando concentrações superiores de extratos de lúpulo, assim como testes *in vitro* para determinar capacidade antimicrobiana, antioxidante, inibição de enzimas (ex: lipoxigenase, colagenase, elastase), e testes em linhas celulares que permitam um primeiro *screening* de eventuais efeitos benéficos para a pele. Adicionalmente, sugere-se a incorporação dos extratos com maior interesse, em formulações cosméticas, que deverão ser sujeitas a testes de estabilidade, de toxicidade e eficácia, a fim de entender o seu comportamento para poderem ser propostas para aplicação em cosméticos.

7. Referências Bibliográficas

- Actions, A., Washington, C. W., Asm, D. C., Parenti, F., Gualberto, G., & Lancini, G. (2004). *Antibiotics: Actions, origins, resistance*, . 95(Walsh 1998), 3059–3060. <https://doi.org/10.1110/ps.041032204>.and
- Afonso, A. F., Pereira, O. R., Válega, M., Silva, A. M. S., & Cardoso, S. M. (2018). Metabolites and biological activities of thymus zygis, thymus pulegioides, and thymus fragrantissimus grown under organic cultivation. *Molecules*, 23(7). <https://doi.org/10.3390/molecules23071514>
- Afonso, A. F., & Pereira, R. (2020). *antioxidants Health-Promoting Effects of Thymus Phenolic-Rich Extracts : Antioxidant , Anti-inflammatory and Antitumoral Properties*. 1–21.
- Almaguer, C., Schönberger, C., Gastl, M., Arendt, E. K., & Becker, T. (2014). Humulus lupulus - a story that begs to be told. A review. *Journal of the Institute of Brewing*, 120(4), 289–314. <https://doi.org/10.1002/jib.160>
- Ansel, H.C.; Popovich, N.G.; Allen Jr., L.V. Farmacotécnica: formas farmaceuticas e sistemas de liberação de fármacos. São Paulo: Premier, 2000.
- ANVISA. (2005). Cosmetics Products Stability Guide
- Arsene, A. L., Rodino, S., Butu, A., Petrache, P., Iordache, O., & Butu, M. (2015). Study on antimicrobial and antioxidant activity and phenolic content of ethanolic extract of humulus lupulus. *Farmacia*, 63(6), 851–857.
- Artigo, G. (1998). Decreto-Lei n.º 296/98, de 25 de Setembro. *Legislação Farmacêutica Compilada*, 4960–4965.
- Bartmańska, A., Wałęcka-Zacharska, E., Tronina, T., Popłoński, J., Sordon, S., Brzezowska, E., Bania, J., & Huszcza, E. (2018). Antimicrobial properties of spent hops extracts, flavonoids isolated therefrom, and their derivatives. *Molecules*,

23(8), 1–12. <https://doi.org/10.3390/molecules23082059>

- Benedetto, A. V. (1998). The environment and skin aging. *Clinics in Dermatology*, 16(1), 129–139. [https://doi.org/10.1016/S0738-081X\(97\)00193-4](https://doi.org/10.1016/S0738-081X(97)00193-4)
- Bolton, J. L., Dunlap, T. L., Hajirahimkhan, A., Mbachu, O., Chen, S. N., Chadwick, L., Nikolic, D., Van Breemen, R. B., Pauli, G. F., & Dietz, B. M. (2019). The Multiple Biological Targets of Hops and Bioactive Compounds. *Chemical Research in Toxicology*, 32(2), 222–233. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.8b00345>
- Chaiyasut, C., Kesika, P., Sakdakampanat, P., Peerajan, S., & Sivamaruthi, B. S. (2018). Formulation and evaluation of stability of thai purple rice bran-based cosmetic products. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 11(1), 99–104. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2018.v11i1.22073>
- Chavasco, J. M., Prado E Felipe, B. H. M., Cerdeira, C. D., Leandro, F. D., Coelho, L. F. L., da Silva, J. J., Chavasco, J. K., & Dias, A. L. T. (2014). Avaliação das atividades antimicrobiana e citotóxica de extratos de plantas do cerrado do Sul de Minas Gerais. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 56(1), 13–20. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652014000100002>
- Cutillas, A. B., Carrasco, A., Martinez-Gutierrez, R., Tomas, V., & Tudela, J. (2018). Thyme essential oils from Spain: Aromatic profile ascertained by GC–MS, and their antioxidant, anti-lipoxygenase and antimicrobial activities. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26(2), 529–544. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2017.05.004>
- Dandlen, S., Miguel, M., & Faleiro, M. L. (2011). *Acetylcholinesterase Inhibition Activity of Portuguese Thymus Species Essential Oils. March*. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2011.10643914>
- Di Sotto, A., Checconi, P., Celestino, I., Locatelli, M., Carissimi, S., De Angelis, M., Rossi, V., Limongi, D., Toniolo, C., Martinoli, L., Di Giacomo, S., Palamara, A. T., & Nencioni, L. (2018). Antiviral and antioxidant activity of a hydroalcoholic extract from humulus lupulus L. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/5919237>

- Durello, R., Silva, L., & Bogusz Jr., S. (2019). Química Do Lúpulo. *Química Nova*, 42(8), 900–919. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170412>
- El Abed, N., Kaabi, B., Smaali, M. I., Chabbouh, M., Habibi, K., Mejri, M., ... Ben Hadj Ahmed, S. (2014). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of thymus capitata essential oil with its preservative effect against listeria monocytogenes inoculated in minced beef meat. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/152487>
- European Medicines Agency. (2014). *Assessment report on Humulus lupulus L., flos*. 44(May), 1–38. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_HMPC_assessment_report/2014/08/WC500170935.pdf
- Falasca, A., Melck, D., Paris, D., Saviano, G., Motta, A., & Iorizzi, M. (2014). Seasonal changes in the metabolic fingerprint of Juniperus communis L. berry extracts by 1H NMR-based metabolomics. *Metabolomics*, 10(1), 165–174. <https://doi.org/10.1007/s11306-013-0566-1>
- Farag, M. A., & Wessjohann, L. A. (2013). Cytotoxic effect of commercial Humulus lupulus L. (hop) preparations - In comparison to its metabolomic fingerprint. *Journal of Advanced Research*, 4(4), 417–421. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2012.07.006>
- Farmacopeia Portuguesa VIII (2005). INFARMED - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, Lisboa, Portugal
- Farnsworth, N. R. (2001). *Botanicals: A Phytocosmetic Desk Reference* By Frank S. D'Amelio, Sr. (Bio-Botanica, Inc., Hauppauge, NY). CRC Press, Boca Raton, FL. 1999. x + 361 pp. 17.5 × 25 cm. \$119.95. ISBN 0-8493-2118-2. *Journal of Natural Products*, 64(6), 845–846. <https://doi.org/10.1021/np000758w>
- Figueiredo, A. C., Pedro, L. G., & Barroso, J. G. (2014). Plantas aromáticas e medicinais. *Revista Da Associação Portuguesa de Horticultura -APH*, 124, 29–33.
- Fraga, C. G., Galleano, M., Verstraeten, S. V., & Oteiza, P. I. (2010). Basic biochemical

mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Molecular Aspects of Medicine*, 31(6), 435–445. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2010.09.006>

- Halla, N., Fernandes, I. P., Heleno, S. A., Costa, P., Boucherit-Otmani, Z., Boucherit, K., Rodrigues, A. E., Ferreira, I. C. F. R., & Barreiro, M. F. (2018). Cosmetics preservation: A review on present strategies. *Molecules*, 23(7), 1–41. <https://doi.org/10.3390/molecules23071571>
- Hofte, A. J. P., Van Der Hoeven, R. A. M., Fung, S. Y., Verpoorte, R., Tjaden, U. R., & Van Der Greef, J. (1998). Characterization of hop acids by liquid chromatography with negative electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 56(3), 118–122. <https://doi.org/10.1094/asbcj-56-0118>
- Joshi LS, & HA, P. (2015). Herbal Cosmetics and Cosmeceuticals: An Overview. *Natural Products Chemistry & Research*, 3(2), 170. <https://doi.org/10.4172/2329-6836.1000170>
- Karabin, M., Hudcova, T., Jelinek, L., & Dostalek, P. (2014). Biotransformations and biological activities of hop flavonoids. *Biotechnology Advances*, 33(6), 1063–1090. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.02.009>
- Karabín, M., Hudcová, T., Jelínek, L., & Dostálek, P. (2016). Biologically Active Compounds from Hops and Prospects for Their Use. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(3), 542–567. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12201>
- Knowlton, J., & Pearce, S. (2014). Handbook of Cosmetic Science & Technology. In *Handbook of Cosmetic Science & Technology*. <https://doi.org/10.1016/B978-1-85617-197-7.50016-2>
- Kowalczyk, D., Świeca, M., Cichocka, J., & Gawlik-Dziki, U. (2013). The phenolic content and antioxidant activity of the aqueous and hydroalcoholic extracts of hops and their pellets. *Journal of the Institute of Brewing*, 119(3), 103–110. <https://doi.org/10.1002/jib.73>

- Kumar, D., Rajora, G., Parkash, O., Antil, M., & Kumar, V. (2016). *Herbal cosmetics : An overview*. 5(12), 36–41.
- Lourenço, J. A. A. (2007). Destilação industrial de óleos essenciais. *Curso Teórico-Prático, 3 edição*(Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Centro de Biotecnologia Vegetal, Lisboa), 80–95.
- Magalhães, P. J., Vieira, J. S., Gonçalves, L. M., Pacheco, J. G., Guido, L. F., & Barros, A. A. (2010). Isolation of phenolic compounds from hop extracts using polyvinylpyrrolidone: Characterization by high-performance liquid chromatography-diode array detection-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217(19), 3258–3268.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.10.068>
- Miguel, M. G. (2010). Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: A short review. *Molecules*, 15(12), 9252–9287.
<https://doi.org/10.3390/molecules15129252>
- Miranda, P. (2015). *Bragança, 13-14-15 de julho 2015*.
- Mitsui T. (1997). 5 Raw materials of cosmetics. In *New cosmetic science* (1st ed., pp. 121– 147). Elsevier
- Morales, R. (n.d.). 21. *Thymus L.* *. Plantas sufruticosas, perennes, erectas o decumbentes. LABIATAE.
- Moreira de Oliveira, A. (2009). *Desenvolvimento de formulações cosméticas com ácido hialurónico*. 100.
- Nabavi, S. M., Marchese, A., Izadi, M., Curti, V., Daglia, M., & Nabavi, S. F. (2015). Plants belonging to the genus *Thymus* as antibacterial agents: From farm to pharmacy. *Food Chemistry*, 173, 339–347.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.042>
- Okereke, J. N., Udebuani, A. C., Ezeji, E. U., Obasi, K. O., & Nnoli, M. C. (2015). Possible Health Implications Associated with Cosmetics : A Review. *Science Journal of Public Health*, 3, 58–63.

<https://doi.org/10.11648/j.sjph.s.2015030501.21>

- Önder, F. C., Ay, M., & Sarker, S. D. (2013). Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of the extracts of *Humulus lupulus L.* and quantification of bioactive components by LC-MS/MS and GC-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(44), 10498–10506.
<https://doi.org/10.1021/jf4031508>
- Ovos, A. D. E., Com, R., & Leite, S. D. E. (2005). *Perfil De Textura E Umidade Espremível De Géis Do*. *25*(1), 153–157.
- PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO. (2009). *REGULAMENTO (CE) N. o 1223/2009*. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009R1223&from=PT>
- Pina-Vaz, C., Rodrigues, A. G., Pinto, E., Costa-de-Oliveira, S., Tavares, C., Salgueiro, L., ... Martinez-de-Oliveira, J. (2004). Antifungal activity of *Thymus* oils and their major compounds. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, *18*(1), 73–78. <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2004.00886.x>
- Raut, J. S., & Karuppayil, S. M. (2014). A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products*, *62*, 250–264.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.055>
- Ribeiro, A.M. Desenvolvimento de produtos cosmeticos: teste de estabilidade. São Paulo: ANVISA, 2001. n.p.
- Rodrigues, J. S. C. (2007). Estudo etnobotânico das plantas aromáticas e medicinais. *Curso Teórico-Prático*, 168–174.
- Roriz, C. L., Barros, L., Carvalho, A. M., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Scientific validation of synergistic antioxidant effects in commercialised mixtures of *Cymbopogon citratus* and *Pterospartum tridentatum* or *Gomphrena globosa* for infusions preparation. *Food Chemistry*, *185*, 16–24.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.136>
- Rota, M. C., Herrera, A., Martínez, R. M., Sotomayor, J. A., & Jordán, M. J. (2008).

Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control*, 19(7), 681–687.

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.07.007>

Santos, A., Rodrigues, S. S. F. B., & Oliveira, E. J. A. De. (2006). *Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de Croton rhamnifolioides*. 2–6.

SEGAWA, S., TAKATA, Y., WAKITA, Y., KANEKO, T., KANEDA, H., WATARI, J., ENOMOTO, T., & ENOMOTO, T. (2007). Clinical Effects of a Hop Water Extract on Japanese Cedar Pollinosis during the Pollen Season: A Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71(8), 1955–1962. <https://doi.org/10.1271/bbb.70157>

SEGAWA, S., YASUI, K., TAKATA, Y., KURIHARA, T., KANEDA, H., & WATARI, J. (2006). Flavonoid Glycosides Extracted from Hop (*Humulus lupulus* L.) as Inhibitors of Chemical Mediator Release from Human Basophilic KU812 Cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70(12), 2990–2997. <https://doi.org/10.1271/bbb.60384>

Silva, A. M., Martins-Gomes, C., Souto, E. B., Schäfer, J., Santos, J. A., Bunzel, M., & Nunes, F. M. (2020). *Thymus zygis* subsp. *zygis* an endemic portuguese plant: Phytochemical profiling, antioxidant, anti-proliferative and anti-inflammatory activities. *Antioxidants*, 9(6). <https://doi.org/10.3390/antiox9060482>

Sousa, M. J. de A. C. de. (2005). *Obtenção de plantas de Humulus lupulus L. resistentes a vírus Maria João de Almeida Coelho de Sousa*. 214. [https://bibliotecadigital.ipb.pt/bitstream/10198/6013/1/Tese%2Bcompleta certa.pdf](https://bibliotecadigital.ipb.pt/bitstream/10198/6013/1/Tese%2Bcompleta%20certa.pdf)

Stevens, J. A. N. F., Ivancic, M., Hsu, V. L., & Deinzer, M. A. X. L. (1997). *Pergamon RESULTS AND*. 44(8), 3–6.

Stevens, J. F., & Page, J. E. (2004). Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: To your good health! *Phytochemistry*, 65(10), 1317–1330. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.04.025>

- Sung, B., Chung, J. W., Bae, H. R., Choi, J. S., Kim, C. M., & Kim, N. D. (2015). Humulus japonicus extract exhibits antioxidative and anti-aging effects via modulation of the AMPK-SIRT1 pathway. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 9(5), 1819–1826. <https://doi.org/10.3892/etm.2015.2302>
- Taârit, B., Bet, I., & Li, F. (2012). *Comparison of Different Extraction Methods for the Determination of Essential oils and Related Compounds from Coriander (Coriandrum sativum L.)*. 803–813.
- Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A., & Cliver, D. O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21(9), 1199–1218. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.02.003>
- Tang, J., Suleria, H. A. R., & Dunshea, F. R. (2019). *Compounds from Medicinal Plants (Hops and Juniper)*. 1–25.
- Tecnologia Farmacêutica. L. Nogueira Prista, A. Correia Alves, Rui Morgado. II Vol. Ed. Fundação Calouste Gulbenkian. 1995.
- Tichota, D. M., Silva, A. C., Sousa Lobo, J. M., & Amaral, M. H. (2014). Design, characterization, and clinical evaluation of argan oil nanostructured lipid carriers to improve skin hydration. *International Journal of Nanomedicine*, 9(1), 3855–3864. <https://doi.org/10.2147/IJN.S64008>
- Tongnuanchan, P., & Benjakul, S. (2014). Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. *Journal of Food Science*, 79(7), 1231–1249. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12492>
- Ultee, A., Bennik, M. H. J., & Moezelaar, R. (2002). The Phenolic Hydroxyl Group of Carvacrol Is Essential for Action against the Food-Borne Pathogen Bacillus cereus. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), 1561–1568. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.4.1561>
- Vasiljević, D., & Bojović, L. (2018). *Organski i prirodni kozmetički proizvodi – koliko su zaista bezbedni?* 990–1007.

- Vichi, S., Riu-Aumatell, M., Mora-Pons, M., Guadayol, J. M., Buxaderas, S., Lopez-Tamames, E. “HSSPME coupled to GC/MS for quality control of *Juniperus communis* L. berries used for gin aromatization.” *Food Chemistry*, 105 (2007): 1748–1754.
- Vieira, R. P., Fernandes, A. R., Kaneko, T. M., Consiglieri, V. O., Pinto, C. A. S. D. O., Pereira, C. S. C., Baby, A. R., & Velasco, M. V. R. (2009). Physical and physicochemical stability evaluation of cosmetic formulations containing soybean extract fermented by *Bifidobacterium animalis*. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 45(3), 515–525. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502009000300018>
- Zanoli, P., & Zavatti, M. (2008). Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 116(3), 383–396. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.01.011>
- Zuzarte, M., Gonçalves, M. J., Cavaleiro, C., Cruz, M. T., Benzarti, A., Marongiu, B., Maxia, A., Piras, A., & Salgueiro, L. (2013). Antifungal and anti-inflammatory potential of *Lavandula stoechas* and *Thymus herba-barona* essential oils. *Industrial Crops and Products*, 44, 97–103. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.11.002>

8. Anexos

Tabela XII – Resultado da determinação do pH das formulações, após preparação (0), 3, 7 e 14 dias depois.

pH	t=0 dias	t=3 dias	t=7 dias	t=14 dias	Diferenças 0-14 dias
Gel base de Carbopol	6±0,00	6,1±0,00	5,9±0,047	6±0,00	0
E.V 1,25%	6,1±0,00	6,1±0,00	6,033±0,047	6±0,00	1
E.V 2,5%	6,13±0,047	6,13±0,047	6,2±0,00	6,16±0,047	-0,03
E.V 5%	6,13±0,047	6,16±0,047	6,033±0,047	6,16±0,047	-0,03
P.V 1,25%	5,96±0,047	6±0,00	5,96±0,047	6,06±0,047	-0,1
P.V 2,5%	6,033±0,047	6±0,00	5,93±0,047	6,13±0,047	-0,09
P.V 5%	6,033±0,047	6,06±0,047	5,96±0,047	6,1±0,00	-0,06
P.F 1,25%	6,13±0,047	6,2±0,00	6,06±0,047	6,1±0,00	0,03
P.F 2,5%	6,1±0,00	6,16±0,047	6,06±0,047	6,16±0,047	-0,06
P.F 5%	6,13±0,047	6,16±0,047	6,1±0,00	6,16±0,047	-0,03
N.V 1,25%	5,96±0,047	6±0,00	6±0,00	6,033±0,047	-0,07
N.V 2,5%	6,06±0,047	6,1±0,00	6,033±0,047	6,06±0,047	0
N.V 5%	6,033±0,047	6,16±0,047	6,06±0,047	6,16±0,047	-0,127
N.F 1,25%	5,96±0,047	6±0,00	5,96±0,047	6±0,00	-0,04
N.F 2,5%	6,033±0,047	6,06±0,047	6,033±0,047	6,06±0,047	-0,027
N.F 5%	6,1±0,00	6,033±0,047	6,06±0,047	6,13±0,047	-0,03

E.F- extrato hidroalcoólico de cones de lúpulo espontâneo; E.V- extrato hidroalcoólico de partes vegetativas de lúpulo espontâneo; N.F- extrato hidroalcoólico de cones de nugget; N.V- extrato

hidroalcoólico de partes vegetativas de nugget; P.F- extrato hidroalcoólico de cones de polaris; P.V- extrato hidroalcoólico de partes vegetativas de polaris.

Tabela XIII – Resultado do pH das formulações no final do teste de humidade relativa e após 8 dias.

	pH no fim do teste de humidade Relativa	pH/t=8 dias
Gel base	6,1	6,1
E.V 1,25%	6,1	6
E.V 2,5%	6,2	6,2
E.V 5%	6,2	6,2
N.V 1,25%	6	6
N.V 2,5%	6,1	6,1
N.V 5%	6,1	6,2
N.F 1,25%	5,9	6
N.F 2,5%	6	6,1
N.F 5%	6,1	6
P.V 1,25%	6	6
P.V 2,5%	6	6
P.V 5%	6,1	6,1
P.F 1,25%	6,1	6,2
P.F 2,5%	6,1	6,2
P.F 5%	6,2	6,1

E.F- extrato hidroalcoólico de cones de lúpulo espontâneo; E.V- extrato hidroalcoólico de partes vegetativas de lúpulo espontâneo; N.F- extrato hidroalcoólico de cones de nugget; N.V- extrato hidroalcoólico de partes vegetativas de nugget; P.F- extrato hidroalcoólico de cones de polaris; P.V- extrato hidroalcoólico de partes vegetativas de polaris.

CARBOPOL E GEL CARBÓMERO

Sinónimos:	Carbomer. Carbómero. Carboxipolimetileno. Carpoleno. Polímero carboxivinílico. Ácido poliacrílico.
INCI/Fórmula quadro:	Carbopol: Carbomer. Gel carbómero: Aqua csp 100%, propylene glycol 5%, carbomer 0,5-1%, imidazolidinyl urea 0,1-0,5%, disodium EDTA 0,05-0,1%, methylchloroisothiazolinone + methyl isothiazolinone 0,01-0,05%. triethanolamine q.s.
Fórmula molecular:	$[-CH_2-CH(COOH)-]_n$
Peso Molecular:	Aprox. 700.000 – 4.000.000.000. Avaliou-se em 104.400 para o Carbopol 940.
Descrição:	Os Carbopóis são polímeros sintéticos do ácido acrílico, de alto peso molecular e carácter aniónico, que dão lugar a dispersões em meio aquoso, hidro-alcoólico, e com diferentes solventes orgânicos. Existem diferentes tipos de Carbopol, que são designados por um número, mas os que mais se utilizam actualmente em farmácia são o Carbopol 934 e o Carbopol 940. Os que têm a letra P depois do número são de elevada pureza, com um teor residual de benzeno muito baixo, que faz com que estejam preparados para via oral (por exemplo: como aglutinante em comprimidos).

Dados Físico-Químicos: **Carbopol 934P e Carbopol 940:**

Pó branco ou quase branco, esponjoso, higroscópico, incha em água e noutros solventes polares, depois de dispersão e neutralização em soluções de hidróxido de sódio. Neutralizada a dispersão, é solúvel em água, álcool, e glicerina. Ponto de fusão: aprox. 260°C (decompõe-se ao fim de 30 min).

Gel carbómero:

Gel transparente, muito viscoso, com algum ar incorporado e com leve odor. pH: aprox. 5,8.

Propriedades e usos:

O Carbopol é utilizado como agente emulsionante, viscosificante, suspensor e gelificante, em fórmulas como soluções, suspensões, cremes, geles e pomadas, que se podem administrar por via oftálmica, rectal e tópica.

Como emulsionante é utilizado na elaboração de emulsões O/W para uso tópico, quando se quer diminuir a proporção de gorduras. Como gelificantes, os carbómeros formam geles neutros transparentes (para se formar o gel é necessário neutralizar o Carbopol com uma base do tipo trietanolamina ou uma solução de hidróxido de sódio a 10%). A transparência depende dos solventes e dos princípios activos utilizados.

Também é utilizado como aglutinante na formulação de comprimidos.

Em formulação magistral, os geles acrílicos de Carbopol costumam ser os de primeira escolha dado que, salvo as suas incompatibilidades, são os que melhores características reológicas têm.

O gel de Carbopol é uma base extensível não gordurosa, que aumenta a absorção dos princípios activos incorporados. Pode ser incorporado na maioria das emulsões, permitindo o espessamento da fase aquosa (cremigeles). A máxima viscosidade é obtida com pH 6-11. Os geles de Carbopol admitem no máximo até 30-40% de álcool nas suas formulações.

É uma base utilizada em agentes anti-seborreicos, hidratantes e revitalizantes. É protector cutâneo contra gorduras e solventes orgânicos e é um emulsionante secundário para aumentar a viscosidade de suspensões e champôs.

É um gel termoestável, pelo que pode ser esterilizado em autoclave.

Uma das aplicações é a formulação de geles fluidos para lágrimas artificiais, no tratamento dos olhos secos.

As reacções dos carbómeros com fármacos básicos como a efedrina formam derivados que podem ser incorporados em geles, o que é útil na formulação de medicamentos de acção prolongada. O denominado "gel condutor de ultra-sons" ou "gel de contacto para ecografias" é um gel aquoso ou hidroalcoólico de Carbopol 940 ao qual se adiciona mais ou menos álcool conforme se queira que seja mais ou menos refrescante. Também se pode adicionar um corante.

Além disso, o Carbopol é usado na indústria cosmética.

Dosagem:

O Carbopol é doseado desta forma:

- Como agente gelificante: 0,5 – 2 %
- Como agente emulsionante: 0,1 – 0,5 %
- Como agente suspensor: 0,1 – 1 %
- Como aglutinante em comprimidos: 0,75 – 3 %
 - Como agente de libertação controlada: 5 – 30 %
- Em unguentos aquosos ou geles de base 0,5 – 5 %
- Em lágrimas artificiais: 0,2 – 0,3%

Pode-se aumentar a consistência do gel aumentando a proporção de Carbopol (até 5%).

Incompatibilidades: Substâncias catiónicas (por exemplo: sulfato de neomicina, cloridrato de procaína, cloridrato de difenidramina, polímeros catiónicos, etc.), electrólitos e iões metálicos (sobretudo sódio, cálcio, alumínio, zinco, magnésio e ferro), ácidos ou bases fortes (pH inferior a 6 ou superior a 9-11), fenol, resorcina e radiações UV.

Conservação:

Em embalagens bem fechadas. PROTEGER DA LUZ E DA HUMIDADE.

Exemplos de formulação: Gel neutro de Carbopol

Carbopol 940P..... 1 %
Água purificada q.s.p. 100 ml
Trietanolamina ou NaOH 10% q.s. pH=7 Conservante q.s.

Gel hidro-alcoólico de Carbopol

Carbopol 940P1 - 2 %
Etanol.....,15%
Água purificada q.s.p. 100 ml
Trietanolamina ou NaOH 10% q.s. pH=7

Modus operandi:

- 1.- Polvilhar o mais uniformemente possível o Carbopol sobre a água ou a mistura de água e álcool e deixar repousar durante 1224 horas para que o gel seja desenvolvido. Se a fórmula tiver glicerina, humedecer previamente o carbopol em almofariz.
- 2.- Neutralizar até pH 7 com trietanolamina (são necessários aprox. 0,8 - 1 g de trietanolamina para gelificar 1 g de Carbopol) ou com uma solução de hidróxido de sódio a 10%.
- 3.- Homogeneizar, evitando na medida do possível a incorporação de ar.
- 4.- É necessária a adição de um conservante caso não tenha álcool (por exemplo: Nipagin de sódio 0,1 %, Dowicil 200 a 0,2 %, ou Phenonip 0,4 %, mas outros como o benzalcónio cloreto ou o sódio benzoato poderão desestabilizá-lo).

Podem-se adicionar 3-5% de glicerina para se evitar que o gel seque.

No caso do gel hidro-alcoólico, não se deve adicionar o álcool no fim, dado que pode fazer com que assumam a cor branca.

Se se trabalhar com o gel neutro já preparado, pode-se adicionar o álcool, homogeneizando mediante agitação suave.

Bibliografia:

- Martindale, *Guía completa de consulta farmacoterapéutica*, 1ª ed. (2003).
- *Formulación magistral de medicamentos*, COF da Biscaia, 5ª ed. (2004).
- *Monografías Farmacéuticas*, C.O.F. de Alicante (1998). - *La Formulación Magistral en la Oficina de Farmacia*, Mª. José Llopis Clavijo e Vicent Baixauli Comes (2007).
- *Formulario Magistral* del C.O.F. de Murcia (1997).

O artigo de revisão que seguidamente se apresenta, não é parte integrante da Dissertação. Foi, no entanto, desenvolvido durante o mesmo período e com o objetivo de, num curto espaço de tempo, ser enviado para publicação.

***Humulus lupulus*: Compostos fitoquímicos, aspetos botânicos, usos tradicionais e atividade biológica e farmacológica para aplicações cosméticas futuras.**

Resumo

O Lúpulo (*Humulus lupulus L.*) é mundialmente conhecido como matéria-prima e aromatizante essencial na produção da cerveja. As inflorescências femininas de lúpulo (*Humulus lupulus L.*) há muito são utilizadas na medicina tradicional. O uso da planta na cosmética também foi relatado. Compostos fitoquímicos da planta como o 8-prenilnaringenina, humulona e lupulona foram utilizados em ensaios para aplicação cosmética. Os compostos flavonoides, potencias bioativos, também tem sido utilizado em cosméticos. Esta revisão apresenta os aspetos botânicos da planta bem como, compostos fitoquímicos, usos tradicionais, atividades biológicas para aplicações cosméticas futuras.

1. Introdução

O conceito de beleza e cosmética é tão antigo quanto o homem e a civilização, desde há muito tempo as pessoas cuidavam da sua aparência e limpeza. O produto cosmético tem uma história que cobre milhares de anos com uso de muitos ingredientes de origem vegetal, animal e mineral (Okereke et al., 2015). Os povos e as civilizações foram armazenando um amplo conhecimento de como manipular muitas das variedades de plantas, muitas delas com propriedade medicinais, aprendendo a manipula-las tendo muitas delas desempenhado um papel importante no desenvolvimento da medicina ao longo de vários séculos (Rodrigues, 2007).

A procura por produtos cosméticos de origem orgânica e natural nos países da União Europeia e no mundo, tem aumentado em consequência da crescente consciência dos consumidores em preservar o meio ambiente e os recursos naturais, e também por acreditarem que esses são mais fiáveis e saudáveis. A possibilidade de produtos cosméticos sem efeitos colaterais e livres de compostos sintéticos nocivos, que podem causar danos a saúde, também tem aumentado a demanda por produtos naturais uma vez que estes oferecem segurança aos consumidores (Joshi LS & HA, 2015; Kumar et al., 2016).

Em comparação com os produtos sintéticos, os produtos de origem natural, não causam graves problemas a pele de acordo com (Kumar et al., 2016) são designados hipoalergénicos. Compostos químicos amplamente utilizados na cosmética, agentes espessantes, como polietileno glicóis, óleos minerais, metais pesados (chumbo, arsénio, níquel) foram considerados tóxicos, causando diversos efeitos colaterais como alergias e irritações que podem levar a inúmeras doenças, entre elas cancro (Okereke et al., 2015).

O *Humulus lupulus* L, tradicionalmente conhecida por lúpulo, é uma planta perene dioica pertencente a família das *Cannabaceae* da ordem *Urticales* (Almaguer, Schönberger, Gastl, Arendt, & Becker, 2014; J. A. N. F. Stevens, Ivancic, Hsu, & Deinzer, 1997). Embora as inflorescências femininas (cones) do lúpulo são conhecidas como matéria-prima que fornece o sabor amargo e o aroma característicos à cerveja (Arsene et al., 2015; European Medicines Agency, 2014; Karabín et al., 2016; Segawa et al., 2006), os cones do lúpulo têm vindo a ser utilizados há muito tempo para fins medicinais, por revelarem benefícios para a saúde (Karabín et al., 2016; Zanolli & Zavatti, 2008). A planta do lúpulo, tem vindo a desempenhar um vasto leque de papéis fisiológicos, como o efeito inibitório na reabsorção óssea (SEGAWA et al., 2006), atividade quimiopreventiva (European Medicines Agency, 2014; Önder et al., 2013; SEGAWA et al., 2006; Zanolli & Zavatti, 2008) propriedades estrogénicas do fitoestrógeno, 8-prenilnaringenina (European Medicines Agency, 2014; Karabín et al., 2016; SEGAWA et al., 2006; Zanolli & Zavatti, 2008), propriedades antialérgicas (SEGAWA et al., 2006, 2007). Os Polifenóis, Óleos essenciais e as Resinas, têm exibido uma vasta gama de propriedades farmacológicas de elevada importância. Além das propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e anticancerígenas, os prenilflavonóides são considerados alguns dos fito-estrógenos mais ativos conhecidos (Karabin et al., 2014; Karabín et al., 2016; J. F. Stevens & Page, 2004; Zanolli & Zavatti, 2008). As atividades biológicas dos prenilflavonóides sugerem que estes tenham potencial para aplicação em programas de prevenção do cancro e na prevenção ou tratamento das ondas de calor (pós-menopausa) e osteoporose (J. F. Stevens & Page, 2004). Das chalconas preniladas presentes no lúpulo, o xanthohumol demonstrou atividade quimiopreventiva do cancro em ensaios *in vitro* (J. F. Stevens & Page, 2004; Zanolli & Zavatti, 2008).

Um estudo realizado por (Weber et al., 2019) avaliou o potencial antioxidante, anti-inflamatório e antibacteriano de um extrato de lúpulo-CO₂ com 50% de humulona e lupulona, onde mostrou ser uma opção de tratamento para peles com tendência acneica. A 8-prenilnaringenina (8-PN), considerado um potente fito-estrogênio localizada nos cones do lúpulo, e derivados do lúpulo contendo 8-PN, tem sido recomendado para aumento do busto (Zierau et al., 2004).

Yang et al., realizaram um estudo para triagem de produtos naturais para uso como ingredientes cosméticos, uma fração solúvel de *Humulus japonicus* exibiu atividade inibitória da tirosinase, sugerindo o *Humulus japonicuse* como um ingrediente clareador em produtos cosméticos (Yang et al., 2018).

As bactérias como *Staphylococcus aureus*, resistentes a metilina, *Staphylococcus epidermidis*, resistente a múltiplas drogas, juntamente com *Cutibacterium acnes*, constituem as principais estirpes de bactérias envolvidas nas doenças de pele. Um estudo realizado por Di Lodovico et al., para a avaliação da atividade antibacteriana e a capacidade de inibir a formação de biofilme, de um extrato de lúpulo utilizado contra estirpes multirresistentes de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *C. acnes*, o extrato exibiu uma boa ação antimicrobiana, com MICs variando de 1 a 16µg /mL e foi capaz de inibir a formação de biofilme de todas as estirpes testadas, exceto para dois *S. aureus* (Di Lodovico et al., 2020).

2. Metodologia

Para a realização desta revisão recorreu-se a motores de busca como: PubMed, Wiley Online Library e ScienceDirect. As palavras chaves utilizadas foram “*Humulus lupulus*, cosméticos, aplicação cosmética, bioatividade.

3. Resultados e Discussão

3.1. Usos tradicionais

A utilização do lúpulo na medicina tradicional remota a mais de 2000 anos, onde era utilizado no combate contra a lepra, o mau odor dos pés, constipação e a purificação do sangue, pelos antigos curandeiros (Karabin et al., 2014; Karabín et al., 2016). Em particular, as preparações de lúpulo eram recomendadas para o tratamento de distúrbios do sono, como um sedativo leve, e para a ativação da função gástrica (Kowalczyk et al., 2013; Önder et al., 2013; Zanolli & Zavatti, 2008). Os chineses, utilizavam o lúpulo no tratamento da ansiedade e da insónia, estimulação do apetite e no combate a dispepsia. Karabin et al., 2014, relataram que o uso de extratos alcoólicos do lúpulo, para o tratamento de doenças como a tuberculose pulmonar, a silicose, asbestose ou lepra revelaram resultados positivos.

Tradicionalmente, o lúpulo era usado para tratar a excitabilidade e a inquietação associadas à cefaleia tensional, para melhorar o apetite e a digestão, aliviar dor de dentes, dor de ouvidos e neuralgia. Além disso, acredita-se que o lúpulo exerça efeitos diuréticos, antiespasmódicos e anafrodisíacos. Tribos indígenas americanas usavam lúpulo como sedativo, antirreumático, analgésico e como auxiliar urinário para pedras nos rins e inflamação (Zanolli & Zavatti, 2008). Há registo do uso dos cones do lúpulo secos e verdes, do Parque Natural de Montesinho, para a preparação de infusões para fins diuréticos e para transtornos do aparelho digestivo, e licores para auxiliar na digestão (Carvalho, 2005).

Um manuscrito científico valioso do Século 15, o Jardim da Saúde, descreveu o efeito do lúpulo no combate as infeções de ouvido. Um botânico alemão Hieronymus Bock, documentou, no século 16, a primeira aplicação do lúpulo na ginecologia. Antigamente as mulheres que faziam a colheita de lúpulo reclamavam de distúrbios menstruais, que apareciam na época de colheita. Tempo depois, demonstraram forte propriedade estrogénica por parte dos compostos de lúpulo. Nos dias de hoje, o lúpulo ou materiais ricos em fito estrogénios são componentes comuns de suplementos dietéticos comercializados para mulheres com sintomas da menopausa ou com distúrbios hormonais (Karabín et al., 2016).

Segundo Duke, o lúpulo é utilizado na indústria cosmética em perfumes, champôs, loções e cremes, e também na aromatização de tabacos e águas minerais, com o seu óleo

essencial. O óleo essencial do lúpulo também é frequentemente utilizado na produção de sobremesas congeladas, gelatinas e pudins, e também em algumas bebidas sem álcool (Duke, 1983).

Os cones do lúpulo são considerados uma fonte natural de aromatizante alimentar para cereais, especiarias, molho, tabaco e também para outras bebidas alcoólicas além da cerveja. Os seus caules eram utilizados na fabricação do tecido grosso e na produção de papel. Também, o lúpulo era utilizado em perfumes, particularmente em perfumes picantes e orientais, em cremes e loções para a pele. (Zanoli & Zavatti, 2008).

Considerando as propriedades exibidas pelos extratos de lúpulo, nos últimos anos, esses têm sido utilizados como agentes conservantes em diferentes produtos alimentares, como por exemplo em carnes fresca e produtos cárneos, onde os extratos vegetais previnem a sua deterioração oxidativa e microbiana, aumentando a vida útil e segurança destes e conferindo propriedades funcionais (Astray et al., 2020).

O lúpulo também é utilizado na cosmética, por exemplo em loções de banho. Astray et al. (2020), relata um estudo onde utilizaram extratos supercríticos de CO₂ de cones de lúpulo a fim de formular géis de banho, e os resultados demonstraram que a adição destes, melhorou várias propriedades da pele dado ao seu conteúdo em ingredientes bioativos. Também, formulações contendo extratos de cones de lúpulo, exibiram compostos para tratamentos da oleosidade nos cabelos e a presença de caspa. Segundo Astray et al., o uso de extratos de lúpulo na cosmética capilar é caracterizada pelas suas propriedades antifúngicas e anti seborreica, que reduzem a sua fragilidade, nutrem, oferecem brilho, aumentam a sua resistência e previnem a sua perda (Astray et al., 2020).

3.2. Classificação botânica e aspetos morfológicos da planta

O *Humulus lupulus* L. vulgarmente conhecido por Lúpulo, é uma planta perene, dióica e normalmente diplóide ($2n=20$) (Heale et al., 1989), com óvulos anátropos pertencente a família das Cannabaceae. O lúpulo (*Humulus lupulus* L.) cresce em solos ricos em matéria orgânica, utilizando como suporte de crescimento, árvores, muros ou paredes altas, tendo como uma das suas características particulares o seu crescimento rápido. Chegam a atingir 7 a 9 metros de altura, em menos de 5 meses (Sousa, 2005). O

caule é peludo, oco, de cor verde ou violeta e de seção geralmente hexagonal que cresce em sentido destrógiro (Marcos et al., 2011). Na Primavera e início do Verão, as plantas crescem enrolando-se aos suportes, segurando-se a estes graças aos tricomas em forma de bigorna ou ganchos que revestem os caules (Sousa, 2005). As folhas são de cor verde-escuras, em forma de coração com 3 a 5 lóbulos, dentadas e com uma superfície muito rugosa (Zanoli & Zavatti, 2008).

Os cones do lúpulo são estruturas semelhantes a pétalas, chamadas brácteas e bractéolas em torno de um eixo central. Na base das bractéolas, as glândulas de lupulina são formadas à medida que o lúpulo amadurece (Almaguer et al., 2014). As inflorescências femininas são as únicas capazes de segregar glândulas de lupulina, onde são sintetizados e acumulados os principais princípios de fermentação do lúpulo, resinas e os óleos essenciais (Almaguer et al., 2014; Zanoli & Zavatti, 2008).

Por se tratar de uma planta dioica, a morfologia das suas flores é facilmente distinta em cada um dos sexos. Nenhuma outra diferença morfológica identifica o sexo da planta. As inflorescências masculinas apresenta panículas multiflorais com cerca de 10 cm de comprimento, enquanto que as inflorescências femininas são amentilhos semelhantes a cones (chamados de estróbilos) se encontram em estróbilos com forma arredondada que, dependendo da variedade, quando completamente desenvolvidos, atingem cerca de 5 a 6 cm (Sousa, 2005; Zanoli & Zavatti, 2008).



Figura 21- A) Campos de lúpulo; B) Inflorescências femininas; C) Glândulas de Lupulina; D) Lupulina; E) Corte longitudinal de um estróbilo; F) Flores e brácteas maduras e secas; Adaptado: (Sousa, 2005)

3.3. Distribuição Geográfica

O Lúpulo é provavelmente originário da China, uma vez que todas as espécies de *Humulus* foram encontradas nas regiões do país, sendo este o responsável pelas primeiras distribuições do lúpulo pelo mundo, nomeadamente para o Japão, a América e Europa (Karabín et al., 2016; Zanolli & Zavatti, 2008). Sugere-se que o nome *Humulus* tenha vindo do Humús, o solo húmido em que a planta cresce (Zanolli & Zavatti, 2008).

Na atualidade, esta espécie é cultivada na Europa central e em todas as regiões temperadas do mundo (Almaguer *et al.*, 2014; Sousa, 2005; J. A. N. F. Stevens et al., 1997; Zanolli & Zavatti, 2008). Embora a origem da sua comercialização seja europeia, a sua distribuição e exploração atual expande-se pela América do Sul, África do Sul, Nova Zelândia e Austrália, onde as regiões de maior produção situam-se na Europa, Região Nordeste dos E.U.A., Austrália, Nova Zelândia e África do Sul (Sousa, 2005). Atualmente, os maiores produtores de lúpulo do mundo são a Alemanha, a EUA, China e República Checa (Karabín et al., 2016). Na flora espontânea da Roménia, o lúpulo

crece em áreas sombreadas perto dos rios à beira das florestas, através de bosques, cultivadas como culturas ou plantas decorativas. Os maiores campos de lúpulo podem ser encontrado na Transilvânia, onde os cones são valorizados pela indústria cervejeira (Arsene et al., 2015).

3.4. Fitoquímico

O Lúpulo tem na sua composição compostos amargos conhecidos como Ácidos Alfa e Ácidos Beta, Óleos Essenciais, Polifenóis e Resinas Totais, sendo os compostos amargos, os compostos de presença universal (European Medicines Agency, 2014; Miranda, 2015; Sousa, 2005). Além desses compostos acima referido, dentro da composição nutricional da planta, ainda podemos encontrar Proteínas, Ácidos Fenólicos, Polissacarídeos e Minerais (European Medicines Agency, 2014).

As inflorescências femininas, produzem um pó amarelo a que podemos chamar lupulina. Dentro das glândulas de lupulina, encontram-se todos os compostos que fazem parte da composição química do Lúpulo (resinas totais, ácidos amargos, óleos essenciais e os prenilflavonoides (Karabin et al., 2014; Miranda, 2015). Os ácidos alfa e ácidos beta são os compostos maioritários do pó (Sousa, 2005).

As resinas totais dividem-se em resinas moles e resinas duras. As resinas moles são conhecidas como solúveis em hexano e as resinas duras solúveis em metanol (Miranda, 2015). Das resinas moles fazem parte os ácidos alfa e os ácidos beta, que constituem a fração mais importante do lúpulo, considerando a sua utilização na indústria cervejeira. São segregados pelas glândulas de lupulina dos cones de lúpulo na forma de um pó amarelo, a lupulina (Almaguer et al., 2014; Karabín et al., 2016; Sousa, 2005). Os ácidos alfa também conhecidos como humulonas (Zanoli & Zavatti, 2008), conferem à cerveja o gosto amargo e são responsáveis pela estabilidade da espuma da cerveja (Almaguer et al., 2014; Miranda, 2015). As suas formas isomerizadas são os responsáveis por transmitir essas características a cerveja (Miranda, 2015). Os ácidos alfa são constituídos por humulonas com três formas, que diferem num radical, podendo assim ser n-humulonas, co-humulonas e ad-humulonas, sendo estes os radicais de maior

importância (Karabín et al., 2016; Miranda, 2015). Os ácidos beta, também conhecidos como lupulonas (Zanoli & Zavatti, 2008), são também precursores do gosto amargo da cerveja, mas de uma forma mais grosseira. São constituídos por lupulonas, aparecendo também as três formas n, co e ad por substituição do radical (R) na sua estrutura química (Miranda, 2015).

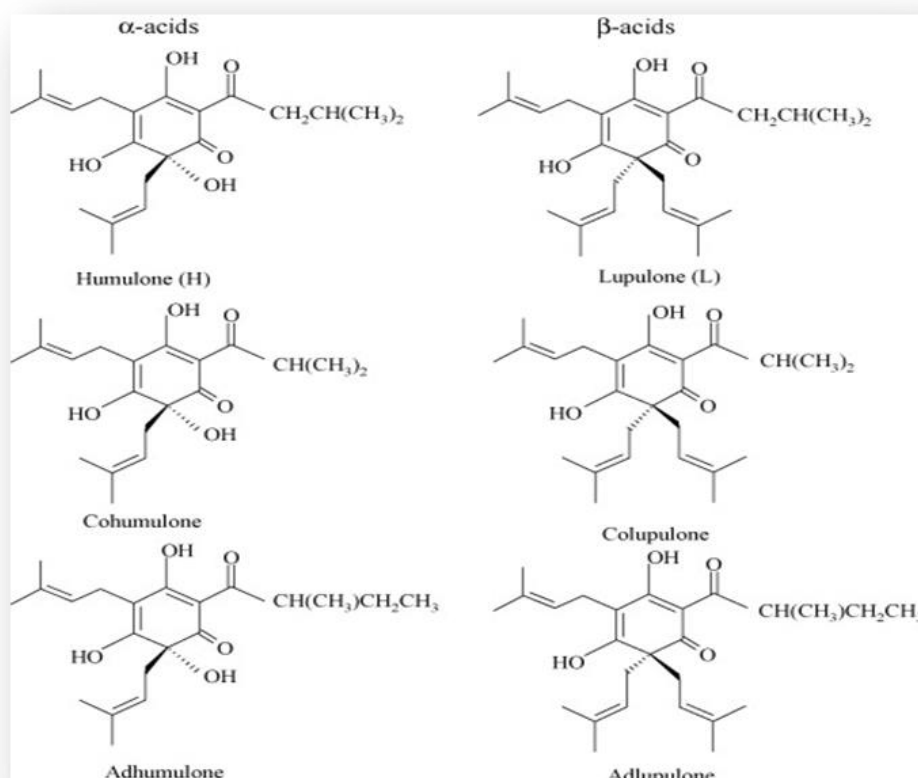


Figura 2 - Estruturas químicas dos ácidos amargos do Lúpulo (Zanoli & Zavatti, 2008).

Os óleos essenciais do *Humulus lupulus*, são os responsáveis por conferir à cerveja o seu perfil aromático (Almaguer et al., 2014; Karabin et al., 2014; Karabín et al., 2016; Miranda, 2015). Constituem um grupo diversificado de compostos com diferentes propriedades físico-químicas, biológicas e organoléticas, segregados pelas glândulas de lupulina (Karabín et al., 2016). Os grupos dos óleos essenciais encontram-se divididos em hidrocarbonetos (monoterpenos, sesquiterpenos e hidrocarbonetos alifáticos),

compostos oxigenados (álcoois terpenos, álcoois sesquiterpênicos e outros compostos oxigenados), compostos que contêm enxofre, sulfuretos e outros compostos de enxofre (Karabín et al., 2016; Miranda, 2015). Durante o amadurecimento, processamento e armazenamento do lúpulo dá-se a fração oxigenada. A fração de enxofre representa uma pequena parte do total dos óleos essenciais, tendo um limiar de sabor muito baixo. É a fração com menor atividade biológica (Karabín et al., 2016).

Os Polifenóis compreendem de 3% a 6% do peso seco dos cones do lúpulo, localizados portanto nos cones da planta com exceção dos prenilflavonoides, segregados pelas glândulas de lupulina (Karabín et al., 2016; Zanolli & Zavatti, 2008). Estão divididos em 4 grupos, flavonoides, flavan-3-ols, ácidos carboxílicos fenólicos e outros compostos fenólicos (prenilflavonoides, estilbenoides) (Karabín et al., 2016). A quercetina, kaempferol e miricetina, são os flavonoides dominantes estando a maioria presentes na forma de glicosídeos, onde o D-glicose e L-ramnose são os grupos de açúcar mais frequentes. Os prenilflavonoides têm sido a classe dos polifenóis mais discutida, exibindo fortes atividades biológicas e benefícios para a saúde humana. O humol, iso-xantohumol, desmethyl xantohumol, e 6- e 8-prenil-arigenina, constituem os principais prenilflavonoides do lúpulo (Karabín et al., 2016).

Os extratos do Lúpulo, o material vegetal descartado após a fabricação da cerveja, são enriquecidos com flavonoides prenilados bioativos que se correlacionam com os benefícios de saúde da planta. O chalcon xanthohumol (XH) é o principal flavonoide pré-alquilado no material do lúpulo processado. O isoxanthohumol (IX), 8-prenilnaringenina (8-PN) e 6-prenilnaringenina (6-PN) fazem parte de flavonoides prenilados bioativos menos abundantes, mas importantes. Estudos farmacocinéticos revelaram que esses flavonoides são conjugados rapidamente com ácido glucurônico (Bolton et al., 2019).

Tabela XIV -. Composição geral do Lúpulo seco em percentagem. Adaptado de: Zanolli & Zavatti, 2008.

<u>Composição</u>	<u>Peso %</u>
<i>Ácidos Alfa</i>	2-12%
<i>Ácidos Beta</i>	1-10%
<i>Óleos Essenciais</i>	0.5-1.5%
<i>Flavonoides</i>	0.5-1.5%
<i>Ácidos Fenólicos, Proteínas</i>	15%
<i>Polissacarídeos</i>	40-50%
<i>Polifenóis</i>	3-6%

3.5. Propriedades Farmacológicas e Biológicas do *Humulus lupulus*

Embora as inflorescências femininas (cones) do Lúpulos sejam conhecidas como matéria-prima que fornece o sabor amargo e o aroma característicos à cerveja (Arsene et al., 2015; European Medicines Agency, 2014; Karabín et al., 2016; SEGAWA et al., 2006), os cones do lúpulo têm vindo a ser utilizados há muito tempo para fins medicinais, por se revelarem benefícios a saúde (Karabín et al., 2016; Zanolli & Zavatti, 2008).

Ácidos amargos e prenilflavonóides são os principais componentes fitoquímicos responsáveis pelo valor medicinal das resinas de lúpulo (Farag& Wessjohann, 2013).

Os Polifenóis, Óleos essenciais e as Resinas, têm exibido uma vasta gama de propriedades farmacológicas de elevada importância. Além das propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e anticancerígenas, os Prenilflavonóides são considerados alguns dos fito-estrógenos mais ativos conhecidos (Karabin et al., 2014; Karabín et al., 2016; J. F. Stevens & Page, 2004; Zanolli & Zavatti, 2008). O mirceno, na maior parte das vezes o mais abundante no lúpulo tem um papel protetor no fotoenvelhecimento da pele humana induzido por UVB. Assim, por ser menos tóxico poderia substituir os produtos químicos do filtro UV usados atualmente em produtos de

proteção solar. Além disso o mirceno protege o cérebro, o coração e os tecidos da pele de inflamação e danos oxidativos (Tarmo Nuutinen, 2018) As atividades biológicas dos prenilflavonóides sugerem que estes tenham potencial para aplicação em programas de prevenção do cancro e na prevenção ou tratamento de afrontamentos (pós-menopausa) e osteoporose (J. F. Stevens & Page, 2004). Das chalconas preniladas presentes no Lúpulo, o Xanthohumol demonstrou atividade quimiopreventiva do cancro em experiências *in vitro* (J. F. Stevens & Page, 2004; Zanolli & Zavatti, 2008) foi possível também determinar alguns passos do processo pelo qual o xanthohumol actua como anti-cancerisno e anti inflamatório (Zhang et al, 2015) e já foi determinado que exerce um efeito protetor das células do fígado contra o stresse oxidativo resultante do envelhecimento (Fernandes-Garcia et al, 2018), Assim como consegue exercer o mesmo efeito protetor no cérebro. Portanto, o xanthohumol tem grande potencial para se desenvolver como um agente terapêutico para melhorar doenças do sistema nervoso relacionadas ao glutamato (Wang et al 2020).

Os flavonoides têm apresentado outros benefícios a saúde, demonstrando ter propriedades antialérgicas, anticoagulantes e assumir atividades anti-colinesterásicas (estratégia terapêutica na doença de Alzheimer) (Karabin et al., 2014).

Os ácidos alfa, têm vindo a demonstrar bloquear o desenvolvimento de várias doenças complexas, referidas como síndrome metabólica (Karabín et al., 2016).

A atividade antibacteriana do lúpulo é atribuída aos Ácidos Alfa e Ácidos Beta, principalmente para as bactérias Gram-positivas. O envolvimento da atividade antibacteriana dos ácidos amargos nas bactérias Gram-positivas, incluindo algumas espécies de *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Mycobacterium* e *Streptomyces*, esta relacionado com a lise primária da membrana, devido as interações das partes hidrofóbicas das moléculas com a parede celular bacteriana (Zanolli & Zavatti, 2008).

Óleos essenciais obtidos por hidrodestilação e clorofórmio de diferentes culturas de lúpulo, revelaram atividade antimicrobiana contra as bactérias Gram-positivas como o, *Staphylococcus aureus*, mas a sua atividade antibacteriana não influencia as bactérias Gram-negativas como a *Escherichiacoli* nem tem efeito sobre a *Candida albicans* (Karabín et al., 2016; Zanolli & Zavatti, 2008).

Revisões recentes sobre as propriedades anti-infecciosas dos constituintes do lúpulo descreveram o xanthohumol como um agente anti-infeccioso de amplo espectro contra as bactérias Gram-positivas como o *staphylococcus aureus* e *streptococcus mutans*, contra vírus como o citomegalovírus, vírus do herpes simples tipo 1 e tipo 2 e vírus da imunodeficiência humana, contra fungos como o *trichophyton spp* e contra os protozoários da malária, o *plasmodium falciparum* (Zanoli & Zavatti, 2008).

Segundo Astray et al., resultados de um estudo realizado por alguns autores, demonstraram que as bactérias Gram-positivas eram altamente inibidas por extratos de lúpulo devido ao seu conteúdo em β -ácido, mas no caso de extratos contendo α -ácido, a inibição era menor. Em contrapartida, as bactérias Gram-negativas exibiram uma alta resistência contra todos os extratos de lúpulo avaliados (Astray et al., 2020).

A atividade antimicrobiana dos polifenóis, baseia-se na inibição da replicação de microrganismos, incluindo bactérias, fungos, parasitas e protozoários. A sua atividade antimicrobiana envolve a capacidade de se acumular dentro das células ou penetrar nas membranas fosfolipídicas das células e provocar inibição.

Numerosos ensaios em animais e ensaios clínicos, levaram a concluir que a maioria dos efeitos benéficos dos polifenóis encontram-se relacionada as suas propriedades antioxidantes, pois demonstraram ser antioxidantes eficazes em uma ampla gama de sistemas de oxidação química, pela sua capacidade de eliminar oxigénio reativo (ROS) ou espécies de nitrogénio, como hidroxila, peroxila, superóxido, peróxido de hidrogénio ou oxigénio singlete. Envolvidos no estresse oxidativo, esses radicais podem desempenhar papéis importantes no desenvolvimento de tumores, aterosclerose, diabetes, doença de Alzheimer, doença de Parkinson ou em todos os processos de envelhecimento. As propriedades antioxidantes dos polifenóis deve-se também pela sua capacidade de suprimir algumas enzimas específicas envolvidas na geração de espécies reativas de oxigénio, como NADPH oxidase, cicloxigenases, xantina oxidase, ou lipoxigenases, contribuindo para a redução de estresse antioxidante (Karabín et al., 2016).

A estrutura química, o número e a posição dos grupos OH no núcleo aromático dos polifenóis, caracterizam o potencial antioxidante dos polifenóis, sendo os grupos OH nas posições C4 e C3, ligados no anel B e o grupo 4 – oxo no anel C, especialmente junto

com uma ligação dupla entre C2 e C3, os determinantes estruturais polifenólicos significativos da atividade antioxidante. Aparentemente, a adição de outros grupos OH, no núcleo aromático na posição C4, aumenta ainda mais as atividades antioxidantes (Karabín et al., 2016).

4. Conclusão

O *Humulus lupulus* é mundialmente conhecido como matéria-prima e aromatizante essencial na produção da cerveja. Desde antiguidade o Lúpulo, especificamente os cones da planta, são utilizados na medicina tradicional, principalmente no tratamento de distúrbios do sono. Vários dos compostos da planta como o xantohumol, 8-prenilnaringenina, os polifenóis, o seu óleo essencial, as resinas e os ácidos alfa e beta, são considerados compostos com propriedades bioativas como propriedades estrogénicas, antialérgicas, anti-inflamatória, antibacteriana entre outras atividades. O lúpulo também é utilizado em preparações cosméticas como aromatizante, géis de banho, cosmética capilar até mesmo para o aumento do busto, podendo ser utilizado para aplicações tópicas. São vários os trabalhos que relatam o lúpulo como uma planta medicinal, enfatizando as suas propriedades bioativas. O estudo da sua aplicação cosmética ainda é pouco relatado, mas com bastante potencial para estudos futuros devida a bioatividade dos seus compostos ativos, que devem, no entanto, ser estudados mais a fundo na vertente de aplicação em cosmética uma vez que a grande maioria dos trabalhos desenvolvidos estão associados á utilização de lúpulo da produção de cerveja, industrial ou artesanal.

Bibliografia

- Almaguer, C., Schönberger, C., Gastl, M., Arendt, E. K., & Becker, T. (2014). *Humulus lupulus* - a story that begs to be told. A review. *Journal of the Institute of Brewing*, 120(4), 289–314. <https://doi.org/10.1002/jib.160>
- Arsene, A. L., Rodino, S., Butu, A., Petrache, P., Iordache, O., & Butu, M. (2015). Study on antimicrobial and antioxidant activity and phenolic content of ethanolic extract of *humulus lupulus*. *Farmacia*, 63(6), 851–857.
- Astray, G., Gullón, P., Gullón, B., Munekata, P. E. S., & Lorenzo, J. M. (2020). *Humulus*

- lupulus L.* as a natural source of functional biomolecules. *Applied Sciences (Switzerland)*, 10(15), 1–18. <https://doi.org/10.3390/app10155074>
- Bolton, J. L., Dunlap, T. L., Hajirahimkhan, A., Mbachu, O., Chen, S. N., Chadwick, L., Nikolic, D., Van Breemen, R. B., Pauli, G. F., & Dietz, B. M. (2019). The Multiple Biological Targets of Hops and Bioactive Compounds. *Chemical Research in Toxicology*, 32(2), 222–233. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.8b00345>
- BoZhang WeiChua PengWeia YingLiu TaotaoWei (2015) Xanthohumol induces generation of reactive oxygen species and triggers apoptosis through inhibition of mitochondrial electron transfer chain complex I. *Free Radical Biology and Medicine*, Volume 89, December 2015, Pages 486-497
- Che Chuan Wang, Yu Hsuan Ho, Chi Feng Hung, Jinn Rung Kuo, Su Jane Wang (2020) Xanthohumol, an active constituent from hope, affords protection against kainic acid-induced excitotoxicity in rats. *Neurochemistry International*, Volume 133, February 2020, 104629
- Cristina Fernández-García, Lisa Rancan, Sergio D. Paredes, César Montero, Mónica de la Fuente, Elena Vara & Jesús A. F. Tresguerres (2019) Xanthohumol exerts protective effects in liver alterations associated with aging. *Eur J Nutr* 58, 653–663 (2019). <https://doi.org/10.1007/s00394-018-1657-6>
- Di Lodovico, S., Menghini, L., Ferrante, C., Recchia, E., Castro-Amorim, J., Gameiro, P., Cellini, L., & Bessa, L. J. (2020). Hop Extract: An Efficacious Antimicrobial and Anti-biofilm Agent Against Multidrug-Resistant Staphylococci Strains and Cutibacterium acnes. *Frontiers in Microbiology*, 11(August), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01852>
- European Medicines Agency. (2014). *Assessment report on Humulus lupulus L., flos.* 44(May), 1–38. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_HMPC_assessment_report/2014/08/WC500170935.pdf
- Farag, M. A., & Wessjohann, L. A. (2013). Cytotoxic effect of commercial *Humulus lupulus L.* (hop) preparations - In comparison to its metabolomic fingerprint. *Journal of Advanced Research*, 4(4), 417–421. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2012.07.006>
- Joshi LS, & HA, P. (2015). Herbal Cosmetics and Cosmeceuticals: An Overview. *Natural Products Chemistry & Research*, 3(2), 170. <https://doi.org/10.4172/2329-6836.1000170>
- Karabin, M., Hudcova, T., Jelinek, L., & Dostalek, P. (2014). Biotransformations and biological activities of hop flavonoids. *Biotechnology Advances*, 33(6), 1063–1090. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.02.009>
- Karabín, M., Hudcová, T., Jelínek, L., & Dostálek, P. (2016). Biologically Active Compounds from Hops and Prospects for Their Use. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(3), 542–567. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12201>

- Kowalczyk, D., Świeca, M., Cichocka, J., & Gawlik-Dziki, U. (2013). The phenolic content and antioxidant activity of the aqueous and hydroalcoholic extracts of hops and their pellets. *Journal of the Institute of Brewing*, 119(3), 103–110. <https://doi.org/10.1002/jib.73>
- Kumar, D., Rajora, G., Parkash, O., Antil, M., & Kumar, V. (2016). *Herbal cosmetics : An overview*. 5(12), 36–41.
- Miranda, P. (2015). *Bragança, 13-14-15 de julho 2015*.
- Önder, F. C., Ay, M., & Sarker, S. D. (2013). Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of the extracts of *Humulus lupulus L.* and quantification of bioactive components by LC-MS/MS and GC-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(44), 10498–10506. <https://doi.org/10.1021/jf4031508>
- Rodrigues, J. S. C. (2007). Estudo etnobotânico das plantas aromáticas e medicinais. *Curso Teórico-Prático*, 168–174.
- SEGAWA, S., TAKATA, Y., WAKITA, Y., KANEKO, T., KANEDA, H., WATARI, J., ENOMOTO, T., & ENOMOTO, T. (2007). Clinical Effects of a Hop Water Extract on Japanese Cedar Pollinosis during the Pollen Season: A Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71(8), 1955–1962. <https://doi.org/10.1271/bbb.70157>
- SEGAWA, S., YASUI, K., TAKATA, Y., KURIHARA, T., KANEDA, H., & WATARI, J. (2006). Flavonoid Glycosides Extracted from Hop (*Humulus lupulus L.*) as Inhibitors of Chemical Mediator Release from Human Basophilic KU812 Cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70(12), 2990–2997. <https://doi.org/10.1271/bbb.60384>
- Sousa, M. J. de A. C. de. (2005). *Obtenção de plantas de Humulus lupulus L. resistentes a vírus Maria João de Almeida Coelho de Sousa*. 214. [https://bibliotecadigital.ipb.pt/bitstream/10198/6013/1/Tese%2Bcompleta certa.pdf](https://bibliotecadigital.ipb.pt/bitstream/10198/6013/1/Tese%2Bcompleta%2Bcerta.pdf)
- Stevens, J. A. N. F., Ivancic, M., Hsu, V. L., & Deinzer, M. A. X. L. (1997). *Pergamon RESULTS AND*. 44(8), 3–6.
- Stevens, J. F., & Page, J. E. (2004). Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: To your good health! *Phytochemistry*, 65(10), 1317–1330. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.04.025>
- Tarmo Nuutinen (2018) Medicinal properties of terpenes found in *Cannabis sativa* and *Humulus lupulus*. *European Journal of Medicinal Chemistry* 157 (2018) 198e228
- Weber, N., Biehler, K., Schwabe, K., Haarhaus, B., Quirin, K. W., Frank, U., Schempp, C. M., & Wölflle, U. (2019). Hop extract acts as an antioxidant with antimicrobial effects against *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus aureus*. *Molecules*, 24(2). <https://doi.org/10.3390/molecules24020223>
- Yang, H. H., Oh, K. E., Jo, Y. H., Ahn, J. H., Liu, Q., Turk, A., Jang, J. Y., Hwang, B. Y., Lee, K. Y., & Lee, M. K. (2018). Characterization of tyrosinase inhibitory

constituents from the aerial parts of *Humulus japonicus* using LC-MS/MS coupled online assay. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 26(2), 509–515. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.12.011>

Zanoli, P., & Zavatti, M. (2008). Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus L.* *Journal of Ethnopharmacology*, 116(3), 383–396. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.01.011>

Zierau, O., Hauswald, S., Schwab, P., Metz, P., & Vollmer, G. (2004). Two major metabolites of 8-prenylnaringenin are estrogenic in vitro. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 92(1–2), 107–110. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2004.06.001>