UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA – DCT
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE JEQUIÉ

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

VANESSA NERES SANTANA

AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE *Humulus lupulus* var. Columbus

JEQUIÉ-BA

DEZEMBRO DE 2020

VANESSA NERES SANTANA

AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE *Humulus lupulus* var. Columbus

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química.

Área de concentração: Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Baraquizio Braga do Nascimento Junior

Coorientador: Prof. Dr. Djalma Menezes de Oliveira

JEQUIÉ-BA

DEZEMBRO DE 2020

S232a Santana, Vanessa Neres.

Avaliação da composição química da atividade biológica de humulus lupulus var. columbus / Vanessa Neres Santana.- Jequié, 2020.

96f.

(Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, sob orientação do Prof. Dr. Baraquizio Braga do Nascimento Junior e coorientação do Prof. Dr. Djalma Menezes de Oliveira)

Rafaella Câncio Portela de Sousa - CRB 5/1710. Bibliotecária – UESB - Jequié

TERMO DE APROVAÇÃO

VANESSA NERES SANTANA

AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE *Humulus lupulus* var. Columbus

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Baraquizio Braga do Nascimento Junior
(UFRJ, Rio de Janeiro - RJ, 2008)
(Orientador)

Prof. Dr. Djalma Meneses de Oliveira
(UFMG, Belo Horizonte - MG, 2012)
(Coorientador)

Profa Dra. Claudia Moraes de Rezende
(UFRJ, Rio de Janeiro - RJ, 1992)

Profa. Dra. Rosane Moura Aguiar
(UFBA, Salvador - BA, 2008)

Dissertação aprovada pelo colegiado do Curso de Pós-Graduação em Química em 18/12/2020.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, por me segurar em todos os momentos que eu não acreditei em mim e pensei em desistir. A meus pais por sempre estarei ao meu lado mesmo distantes, por acreditarem em mim, confiarem e sempre estarem me apoiando. A todos os amigos e aqueles que eu fiz nessa jornada. A todos os professores que fizeram parte do meu processo de formação. Ao meu orientador Prof. Dr. Baraquizio que aceitou me orientar neste trabalho, por todo suporte e apoio. Ao meu coorientador Prof. Dr. Djalma por todos os ensinamentos, suporte e apoio. A UESB, e ao Programa de Pós-graduação em Química. A CAPES e FAPESB pela ajuda financeira e aos membros da banca.

AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE *Humulus lupulus* var. Columbus

Autor: Vanessa Neres Santana

Orientador: Prof. Dr. Baraquizio Braga do Nascimento Junior

Coorientador: Prof. Dr. Djalma Menezes de Oliveira

RESUMO: O lúpulo (*Humulus lupulus* L.) é uma trepadeira pertencente da família Cannabaceae, ordem Rosales, nativa de regiões temperadas do hemisfério norte. Planta usada na medicina tradicional há mais de 2000 anos (destaque para tratamento de hanseníase, odor nos pés provocados por fungos, constipação e eliminação de toxinas do sangue), graças ao potencial bioativo dos constituintes presentes nos seus cones (inflorescência). Formulações a base de lúpulo são prescritos como medicamentos antiespasmódico, antitussígeno, antipirético e antiinflamatório, inclusive nas infecções odontológicas e para o controle da ansiedade. No Brasil, o cultivo e a produção do lúpulo tiveram início nos últimos seis anos na região sul do país, devido aos fatores favoráveis do clima subtropical desta região. Os cones da planta feminina encontram-se glândulas secretoras de lupulina, constituído por substâncias químicas ativas de interesse para indústria cervejeira, farmacêutica e de alimentos. O presente trabalho objetivou o estudo da constituição química e os potenciais antioxidante e antimicrobiano do óleo essencial e da resina *H. lupulus* var. Columbus cultivado no Brasil, bem como, comparar os resultados obtidos com os dados disponíveis na literatura para lúpulo da mesma espécie comercializado na forma de peletes (EUA). Neste estudo se confirmou que há diferenças na composição química e na concentração percentual de alguns compostos identificados, tanto no óleo essencial, quanto na resina das variedades estudadas e que, em alguns casos, essas diferenças químicas influenciaram nos seus potenciais biológicos. Os resultados indicaram que o óleo essencial de lúpulo cultivado no Brasil apresentou uma excelente diversidade de compostos voláteis, tendo, entre os constituintes, o monoterpeno mirceno (1-36%), e os sesquiterpenos humuleno (0,10-14%), β-selineno (0,45-19%) e β-cariofileno (2-10%). Analisados por CLAE, as resinas de lúpulo Columbus apresentaram concentrações expressivas de ácidos amargos (10-45% de cohumulona, 19-37% de N+adhumulona, 36-39% de colupulona e, 31-33% de N+adlupulona), totalizando um conteúdo de 30 a 80% em α-ácidos. Ensaios biológicos (*in vitro*) destes extratos detectaram atividades antioxidante (>85 AA% de DPPH) e antibacteriana (64-1024 μg/mL) sobre bactérias do gênero *Staphylococcus, Pseudomonas, Escherichia e Bacillus*. As características químicas e farmacológicas encontradas na variedade de lúpulo cultivado no Brasil foram consideradas desejáveis para que seus extratos possam ser considerados como matéria prima para as indústrias de alimentos, bebidas e produtos farmacêuticos. Resultados de análises estatísticas multivariadas por ACP indicaram que há diferenças significativas nas características químicas e farmacológicas entre a variedade de lúpulo cultivado no Brasil e a variedade comercial importada dos EUA.

Palavras-chave: *Humulus lupulus* Columbus, óleo essencial, resina, atividade antioxidante e antimicrobiana, citotoxicidade.

EVALUATION OF THE CHEMICAL COMPOSITION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF *Humulus lupulus* var. Columbus

Author: Vanessa Neres Santana

Advisor: Prof. Dr. Baraquizio Braga do Nascimento Junior

Coadvisor: Prof. Dr. Djalma Menezes de Oliveira

ABSTRACT: The hops (*Humulus lupulus L.)* is a vine belonging to the Cannabaceae family, order Rosales, native to temperate regions of the northern hemisphere. Plant used in traditional medicine for over 2000 years (emphasis on leprosy treatment, odor on the feet caused by fungi, constipation and elimination of toxins from the blood), thanks to the bioactive potential of the constituents present in its cones (inflorescence). Hop-based formulations are prescribed as antispasmodic, antitussive, antipyretic and anti-inflammatory drugs, including dental infections and anxiety control. In Brazil, the cultivation and production of hops started in the last six years in the southern region of the country, due to the favorable factors of the subtropical climate of this region. The cones of the female plant are lupulin-secreting glands, consisting of active chemicals of interest to the brewing, pharmaceutical and food industries. The present work aimed to study the chemical constitution and the antioxidant and antimicrobial potentials of essential oil and *H. lupulus* var. Columbus grown in Brazil, as well as, compare the results obtained with the data available in the literature for hops of the same species sold in the form of pellets (USA). In this study it was confirmed that there are differences in the chemical composition and in the percentage concentration of some identified compounds, both in the essential oil and in the resin of the studied varieties, and that, in some cases, these chemical differences influenced their biological potentials. The results indicated that the hop essential oil grown in Brazil showed an excellent diversity of volatile compounds, having, among the constituents, the monoterpene mycrene (1-36%), and the sesquiterpenes humulene (0.10-14%), *β*-selinene (0.45-19%) and *β*-caryophyllene (2-10%). Analyzed by HPLC, the Columbus hop resins showed expressive concentrations of bitter acids (10-45% cohumulone, 19-37% N + adhumulone, 36-39% colupulone and, 31-33% N + adlupulone), totaling a content of 30 to 80% in α-acids. Biological tests (*in vitro*) of these extracts detected antioxidant (> 85 AA% DPPH) and antibacterial (64-1024 µg / mL) activities on Staphylococcus, Pseudomonas, Escherichia and Bacillus bacteria. The chemical and pharmacological characteristics found in the variety of hops grown in Brazil were considered desirable so that their extracts can be considered as raw material for the food, beverage and pharmaceutical industries. Results of multivariate statistical analyzes by ACP indicated that there are significant differences in chemical and pharmacological characteristics between the variety of hops grown in Brazil and the commercial variety imported from the USA.

Keywords: *Humulus lupulus* Columbus, essential oil, resin, antioxidant and antimicrobial activity, cytotoxicity.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 15
2. OBJETIVOS 17
3.REFERÊNCIAS 18
Capítulo 1. Um estudo de prospecção tecnológica de patentes sobre *Humulus lupulus* 20
1. Introdução 21
2. Abordagem Metodológica 25
3. Resultados e Discussão 25
3.1. Associação das palavras-chave com CIP e CCP 26
3.2. Mapeamento de patentes por ano 30
3.3. Mapeamento de patentes por país 31
Considerações Finais 33
Referências Bibliográficas 34
Capítulo 2. Óleo essencial do *Humulus lupulus* var. Columbus: Análise da composição química, atividade antioxidante, antibacteriana e de Citotoxicidade. 36
1. Introdução 36
2. Materiais e métodos 38
2.1 Produtos químicos e reagentes 38
2.2. Amostras de Lúpulo 38
2.3. Extração do óleo essencial 39
2.4. Análise da Composição química dos óleos essenciais 39
2.5. Análise multivariada de dados dos óleos essenciais 40
2.6. Redutores totais (Folin-Ciocalteau) 40
2.7. Ensaio da atividade antioxidante 41
2.8. Ensaio de atividade antibacteriana 42
2.8.1. Meios de cultura 43
2.8.2. Bactérias 43
2.8.3. Inóculo 43
2.8.4. Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) 44
2.9. Ensaio da avaliação citotóxica 45
2.9.1. Eritrócitos humanos 45
2.9.2. Avaliação do potencial hemolítico em eritrócitos humanos 45
2.9.3. Análise estatística 46
3. Resultados e discussão 46
3.1- Composição química dos óleos essenciais do lúpulo Columbus 46

3.2 Análise multivariada de dados dos óleos essenciais 51
3.3. Ensaio de atividade antioxidante 56
3.4. Ensaio de atividade antibacteriana 58
3.5. Ensaio da avaliação citotoxicidade 60
Considerações Finais 62
Referências Bibliográficas 63
Capítulo 3. Resina do *Humulus lupulus* var. Columbus cultivado no Brasil: Análise da composição química, atividade antioxidante, antibacteriana e de Citotoxicidade. 71
1. Introdução 71
2. Materiais e métodos 72
2.1 Produtos químicos e reagentes 73
2.2. Amostras de Lúpulo 73
2.3. Extração da resina 73
2.4. Identificaçao e quantificação de humulonas e lupulonas 74
2.5. Análise multivariada de dados das Resinas 74
2.6. Fenólicos totais (Folin-Ciocalteau) 74
2.7. Ensaio de atividade antioxidante 75
2.8. Ensaio de atividade antibacteriana 76
2.8.1. Meios de cultura 77
2.8.2. Bactérias 77
2.8.3. Inóculo 77
2.8.4. Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) 78
2.9. Ensaio da avaliação citotoxicidade 79
2.9.1. Eritrócitos humanos 79
2.9.2. Avaliação do potencial hemolítico em eritrócitos humanos 79
2.9.3. Análise estatística 80
3. Resultados e discussão 80
3.1. Composição química da resina do lúpulo (humulonas e lupulonas) 80
3.2 Análise multivariada de dados das resinas 83
3.3. Ensaio de atividade antioxidante 86
3.4. Ensaio de atividade antibacteriana 88
3.5. Ensaio da avaliação citotoxicidade 89
Considerações Finais 92
Referências Bibliográficas 93
CONSIDERAÇÕES FINAIS 96

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1. Um estudo de prospecção tecnológica de patentes sobre *Humulus lupulus*

Figura 1. Estruturas químicas dos principais α-ácidos majoritários do lúpulo.....22

Figura 2. Estruturas químicas dos principais β-ácidos majoritários do lúpulo.....22

Figura 3.Estrutura química do principal constituinte da resina dura.....23

Figura 4. Estruturas de alguns terpenos presentes no óleo essencial de lúpulo.....23

Figura 5. Estruturas dos prenilflavonóides: 8-prenilnaringenina e isoxanthohumol.....24

Figura 6. Distribuição do número de patentes por classe, referente às palavras-chave *lupulus* e lúpulo associados com os códigos da CIP nas bases de dados INPI e EPO.....27

Figura7. Distribuição do número de patentes referente aos termos: *lupulus* e lúpulo associado com os códigos da CCP na base de dados EPO 29

Figura 8. Resultado anual do depósito de patentes na EPO e INPI relacionadas aos termos lupulus e lúpulo 30

Figura 9. Distribuição dos depósitos de patentes por países de origem relacionados aos termos lupulus e lúpulo na base de dados EPO e INPI 32

Capítulo 2. Óleo essencial do *Humulus lupulus* var. Columbus: Análise da composição química, atividade antioxidante, antibacteriana e de Citotoxicidade

Figura 1. Curva de calibração para determinar o conteúdo total de compostos redutores.....41

Figura 2. Curva de calibração para determinar a inibição radical ABTS.....42

Figura 3. Cromatogramas de CG-DIC das amostras do óleo essencial do lúpulo Columbus ..47

Figura 4. Screen-plot para os dados provenientes da análise elementar das amostras do óleo de lúpulo.....54

Figura 5. Gráfico dos escores da PC1 versus PC2 para as amostras do óleo de lúpulo. .... **Erro! Indicador não definido.**55

Figura 6. Gráfico dos loadings da PC1 versus PC2 para as amostras do óleo de lúpulo. 55

Figura 7. Avaliação da citotoxicidade do óleo de lúpulo em eritrócitos humanos.....61

Capítulo 3. Resina do *Humulus lupulus* var. Columbus cultivado no Brasil: Análise da composição química, atividade antioxidante, antibacteriana e de Citotoxicidade

Figura 1. Curva de calibração para determinar o conteúdo total de compostos redutores.....75

Figura 2. Curva de calibração para determinar a inibição radical ABTS.....76

Figura 3. Cromatograma de CLAE do padrão autêntico α-β-Ácido (ICE-3).....81

Figura 4. Cromatogramas de CLAE de α-β-Ácido das amostras de resina extraída com MeOH/DiEth 81

Figura 5. Curvas de calibração não-linear (função inversa da parábola) 82
Figura 6. Screen-plot para os dados provenientes da análise elementar das amostras de resina 84
Figura 7. Gráfico dos escores da PC1 versus PC2 para as amostras da resina lúpulo 85
Figura 8. Gráfico dos loadings da PC1 versus PC2 para as amostras da resina de lúpulo..... 86
Figura 9. Avaliação da citotoxicidade da resinade lúpulo extraída com solvente orgânico em eritrócitos humanos. 90

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1. Um estudo de prospecção tecnológica de patentes sobre *Humulus lupulus*

Tabela 1. Número de patentes encontradas nos bancos de dados do INPI e EPO através de uma busca avançada associando as palavras-chave com os códigos da CIP e CCP 26

Capítulo 2. Óleo essencial do *Humulus lupulus* var. Columbus: Análise da composição química, atividade antioxidante, antibacteriana e de Citotoxicidade

Tabela 1. Composição química do óleo essencial de lúpulo Columbus..... 48

Tabela 2. Valores para as correlações entre componentes principais e variáveis do óleo de lúpulo. 52

Tabela 3. Determinação da atividade antioxidante do óleo essencial de lúpulo 57

Tabela 4. Avaliação da CIM (1024 a 4 µg/mL) de óleo essencial de lúpulo sobre bactérias e leveduras 58

Capítulo 3. Resina do *Humulus lupulus* var. Columbus cultivado no Brasil: Análise da composição química, atividade antioxidante, antibacteriana e de Citotoxicidade

Tabela 1. Concentração percentual das frações de α-β-ácidos da resina..... 83

Tabela 2. Valores para as correlações entre α-ácidos (humulonas) β-ácidos (lupulonas) da resina de lúpulo..... 84

Tabela 3. Determinação da atividade antioxidante da resina de lúpulo 87

Tabela 4. Avaliação da CIM (1024 a 4 µg/mL) da resina de lúpulo sobre bactérias e leveduras 88

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS - (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)6-ácido sulfônico)

ACP - Análise dos Componentes Principais

ASBC - American Society of Brewing Chemists

ASD - Agar Sabouraud Dextrose

BHI - Brain Heart Infusion BHI

CBHI - Caldo Brain Heart Infusion

CCP - Classificação Cooperativa de Patentes

CG-DIC - Cromatógrafo a Gás acoplado a um Detector de Ionização em Chama

CG-EM - Cromatógrafo a Gás acoplado ao Espectrômetro de Massas quadrupolar

CIM - Concentração inibitória mínima

CIP - Classificação Internacional de Patentes

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CPC - Cooperative Patent Classification

DMSO - Dimetilsulfóxido

DPPH - (2,2- difenil-1-picrilhidrazilo)

EAG - Equivalentes de ácido gálico

EPO - European Patent Office

ICE-3 - International Calibration Extract 3

INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial

IR_{Exp} - Índices de retenção experimental
IRL - Índices de retenção linear

$IR_{lit.}$ - Índices de retenção literários
NIST 14 - Mass Spectral Library, 2014

MeOH/DiEth – Metanol e éter dietílico

OCE - Óleo essencial do lúpulo da flor seca em estufa

OCL - Óleo essencial do lúpulo da flor liofilizadas

OCN - Óleo essencial do lúpulo da flor in natura

OCP - Óleo essencial do lúpulo em pellets

OMPI - Organização Mundial de Propriedade Intelectual

PC - Principal componente

RCE - Resina extraída da flor seca em estufa

RCL - Resina extraída da flor liofilizada

RCN - Resina extraída da flor in natura

RCP - Resina extraída dos pellets

RPMI - Roswell Park Memorial Institute

TEAC - Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox

TFA - Ácido Trifluoroacético

t_R – tempo de retenção

1. INTRODUÇÃO

O lúpulo (*Humulus lupulus* L.) é uma trepadeira que pertence à família *Cannabaceae*, ordem *Rosales*, nativa de regiões temperadas do hemisfério norte. O gênero *Humulus* inclui três espécies, *Humulus lupulus, Humulus japonicus* e *Humulus yunnanensis*, porém apenas *H. lupulus* produz cones resinosas e é de interesse industrial, pois apresenta em suas flores glândulas secretoras de lupulina **(**Almaguer*et al*., 2014).

O lúpulo é usado como planta medicinal a mais de 2000 anos, era comumente usada para hanseníase, odor nos pés, constipação e para purificação do sangue, graças ao potencial bioativo dos constituintes presentes nos seus cones (flores). A planta tem sido utilizada como aditivo de medicamentos que visam o controle da ansiedade, espasmos, tosse, febre, dor de dente e inflamação, além disso, estudos *in vitro e in vivo* também demostraram o potencial de alguns compostos presentes no lúpulo para se tornarem novos agentes anticâncer. A investigação do potencial in vivo de lúpulo e constituintes do lúpulo para a formulação de medicamentos é de grande importância e promissora (Knez Hrnčič *et al*., 2019; Karabin *et al*., 2015; Koetter & Biendl, 2010; Chattopadhyay, 2010).

A produção mundial de lúpulo no ano de 2018, de acordo com dados da FAOSTAT (2020), foi de mais de 150.000 toneladas, sendo os principais produtores mundiais, USA, Alemanha, Etiópia e China. No Brasil o cultivo do lúpulo teve inicio nos últimos 6 anos, devido as condições climáticas mais favoráveis, a sua produção esta concentrada na região sudoeste, sul e centro-oeste, no entanto outras regiões, como norte e nordeste já iniciaram o processo de cultivo. O lúpulo apresenta diferentes variedades, dentre elas, uma das que mais se adaptou ao clima brasileiro foi à variedade Columbus, também chamadade CTZ (‘Columbus’, ‘Tomahawk’ e ‘Zues’), a mesma é originada dos Estados Unidos e é classificada como lúpulo de dupla aptidão (aroma e amargor) (Ceola, 2020; Spósito*et al*., 2019).

Após a colheita das flores do lúpulo é necessário eliminar cerca de 10 % da água e mantê-las refrigeradas, tendo como propositomantera estabilidade dos constituintes presentes nas glândulas lupulinas, uma vez que a concentração dos ácidos responsáveis pelo amargor diminuem em 50 a 70 % em apenas 6 meses, além disso são sensíveis ao oxigênio e um aumento de 10 ºC da temperatura duplica a degradação desses ácidos. Devido a isso cerca de 60 % do lúpulo que é comercializado se encontrana forma de pellet, sendo essa a melhor forma de manter o maior nível da atividade original do lúpulo após a colheita. No entanto, é preciso levar em consideração que os níveis dos ácidos amargos e constituintes do óleo

essencial dependem também da variedade de lúpulo e das suas condições de cultivo (solo, condições climáticas e manejo) **(**Almaguer *et al*., 2014; Koetter & Biendl, 2010).

É somente na planta fêmea do lúpulo que ocorre o aparecimento de inflorescências que formam os cones da planta onde se produz glândulas secretoras de lupulina, capazes de sintetizar e armazenar resinas com ácidos amargos (α e β), óleos essenciais, compostos fenólicos e polifenóis, que são considerados os componentesmais importantes da planta, agregando importância biológica aos produtos que o utilizam (Clark *et al*., 2013; Garris, 2011)

Na resina são encontrados os ácidos amargos, constituído por α-ácidos e β-ácidos (humulonas e lupulonas, respectivamente), esses ácidos são misturas de análogos, onde dentre eles os principais constituintes dos α-ácidos são: humulona, cohumulona e, adhumulona, e dos β-ácidos são: lupulona, colupulona e, adlupulona, esses compostos vem sendo usados para aplicações biomédicas por apresentarem potencial atividade biológica**,** como por exemplo**,** antioxidante e antimicrobiana (Durello *et al*., 2019; Karabín *et al*., 2016)

O óleo essencial do lúpulo apresenta uma grande variedade de compostos com diferentes propriedades físico-químicas, biológicas e propriedades organolépticas, que são divididos em 3 frações: hidrocarbonetos (monoterpenos e sesquiterpenos), compostos oxigenados (álcoois terpenos, álcoois sesquiterpenos, e outros compostos oxigenados) e compostos contendo enxofre (tioésteres, sulfetos e outros compostos de enxofre) (Koetter & Biendl, 2010; Karabín *et al*., 2016).

A classe dos polifenóis compreende cerca de 3-6 % do peso dos cones de lúpulo, atribuindo à planta um grande potencial bioativo. Dentre a grande variedade desses compostos secretados pelas glândulas lupulinas, os flavonoides têm despertado o interesse das indústrias farmacêuticas e alimentícia devido aos efeitos de promoção da saúde, como cardioprotetor, antioxidante, anti-inflamatório, atividades anticarcinogênicas e antimicrobianas (Karabin *et al*., 2015).

Nos últimos 20 anos o lúpulo vem sendo submetido a diferentes estudos, devido aos seus compostos apresentarem atividades muito interessantes, principalmente para a saúde humana, uma vez que a planta também apresenta baixa toxicidade, podendo ser usado como aditivo de suplementos alimentares, medicamentos ou cosmético (Karabín *et al*., 2016; Dresel *et al*., 2015; Van Breemen *et al*., 2014).

Porém, ainda existem poucos estudos que relacionam características fitoquímicas, genéticas e processo de cultivo com os metabólicos secundários da planta, tornando importantes estudos que avaliem as possíveis mudanças na composição química e atividade

biológica em comparação com a planta de mesma variedade do país de origem (Gonçalves *et al*., 2014; Mongelli *et al*., 2015; Dresel *et al*., 2016). Desse modo estudos como este podem servir de auxílio para a criação e manipulação genética de planta de lúpulo com o objetivo de atingir níveis maiores de compostos biologicamente ativos, principalmente para as plantas cultivadas hoje no Brasil (Karabin *et al*., 2015).

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Realizar uma avaliação química e biológica do óleo essencial e da resina do *Humulus lupulus* da variedade Columbus cultivado no Brasil e compará-lo com o lúpulo industrializado (EUA) de mesma espécie.

Objetivos específicos:

Capítulo 1:

- Realizar um mapeamento tecnológico referente ao *Humulus lupulus*, verificando os tipos de patentes registradas, os números e as frequências dos depósitos, os perfis de depositantes, os países com mais pedidos de patentes e detentores dessa tecnologia, fornecendo, portanto, uma visão geral do desenvolvimento tecnológico relacionado a essa planta.

Capítulo 2:

- Identificar por CG-EM e CG-DIC os compostos presente do óleo essencial do lúpulo brasileiro e compará-lo com o lúpulo de mesma variedade (EUA) e realizar uma análise com componentes principais (ACP);
- Determinar a capacidade redutora e antioxidante do óleo essencial e da resina do lúpulo brasileiro e compará-lo com o lúpulo de mesma variedade (EUA);

Capítulo 3:

- Quantificar por CLAE o teor de α-ácidos (cohumolona, adhumulona + humulona) e β-ácidos (colupulona e adlupulona + lupulona) do lúpulo brasileiro e compará-lo com o lúpulo de mesma variedade (EUA);
- Avaliar as atividades antimicrobianas e citotóxicas do óleo essencial e da resina do lúpulo brasileiro e compará-lo com o lúpulo de mesma variedade (EUA).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almaguer, C., Schonberger, C., Gastl, M., Arendt, E. K., Becker, T (2014). *Humulus lupulus* – a story that begs to be told. *A review Inst. Brew*, *120*, 289. https://doi.org/10.1002/jib.160

Ceola, D. (2020) Aspectos do Lúpulo no Brasil. Diponível em: http://beerschool.com.br/author/duan/. Acesso Junho 2020.

Chattopadhyay, D. (2010). Ethnomedicine: A Source of Complementary Therapeutics. *Research Signpost*, T.C. 37/661 (2), Fort P.O., Trivandrum-695 023 Kerala, India. ISBN: 978-81-308-0390-6

Clark, S. M., Vaitheeswaran, V., Ambrose, S. J., Purves, R. W., & Page, J. E. (2013). Transcriptome analysis of bitter acid biosynthesis and precursor pathways in hop (Humulus lupulus). *BMC Plant Biology*, 13(1), 12. https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-12

Dresel, M., Dunkel, A., Hofmann, T. (2015).Sensomics analysis of key bitter compounds in the hard resin of hops (*Humulus lupulus* L.) and their contribution to the bitter profile of pilsner-type beer.*J Agr Food Chem* 63(13):3402–18. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00239

Dresel, M., Vogt, C., Dunkel, A., Hofmann, T. (2016). The bitter chemodiversity of Hops (*Humulus lupulus L.*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(41), 7789–7799. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b03933

Durello, R. S., Silva, L. M., Bogusz jr, S. (2019). Química do lúpulo. *Quimica Nova*, Vol. 42, No. 8, 900-919. Epub Oct 21, 2019. ISSN 1678-7064. https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170412

FAOSTAT. (2020). Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database. Disponível em: http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC. Acesso agosto 2020.

Garris, A. (2011). State's first hops specialist on tap to promote New York beer production.*Cornell University*. [Online] Available at: http://www.news.cornell.edu/stories/2011/06/states-first-hops-specialist-tap. Acesso Junho 2019.

Gonçalves, J. L., J. A. Figueira, F. P. Rodrigues, L. P. Ornelas, R. Branco, C. L. Silva, and J. S. Camara. (2014). A powerful methodological approach combining headspace solid phase microextraction, mass spectrometry and multivariate analysis for profiling the volatile metabolomic pattern of beer starting raw materials. *Food Chemistry* 160:266–280. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.065

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

Karabin, M., Hudcova, T.; Jelinek, L.; Dostalek, P. (2015). Biotransformations and biological activities of hop flavonoids. *Biotechnology Advances*. 33, 1063–1090. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.02.009

Knez Hrnčič, M., Španinger, E., Košir, I., Knez, Ž.,& Bren, U. (2019). *Hop* Compounds: Extraction Techniques, Chemical Analyses, Antioxidative, Antimicrobial, and Anticarcinogenic Effects. *Nutrients*, 11(2), 257. https://doi.org/10.3390/nu11020257

Koetter, U. & Biendl, M. (2010). Humulus lupulus.A Review of its Historic and Medicinal Uses. *HerbalGram*, Issue: 87 Page: 44-57.

Mongelli, A., Rodolfi, M., Ganino, T., Marieschi, M., Dall'asta, C., Bruni, R. (2015). Italian hop germplasm: Characterization of wild Humulus lupulus L. genotypes from Northern Italy by means of phytochemical, morphological traits and multivariate data analysis. *Industrial Crops and Products*, 70, 16–27. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.02.036

Spósito, M. B., Ismael, R. V., Barbosa, C. M. de A., Tagliaferro, A. L. (2019). A cultura do lúpulo. Piracicaba: ESALQ - *Divisão de Biblioteca*, 81 p.: il.

Van Breemen, R. B., Yuan, Y., Banuvar, S., Shulman, L. P., Qiu, X., Alvarenga, R. F. R., Chen, S., Dietz, B. M., Bolton, J. L., Pauli, G. F., Krause, E., Viana, M., Nikolic, D. (2014). Pharmacokinetics of prenylated hop phenols in women following oral administration of a standardized extract of hops. *Molecular Nutrition & Food Research*, 58(10), 1962–1969. https://doi.org/10.1002/mnfr.201400245

Capítulo 1. Um estudo de prospecção tecnológica de patentes sobre *Humulus lupulus*

Santana, V. N.; Nascimento Junior, B. B*

A Study of Patent Technological Prospecting on *Humulus lupulus*

Abstract: Patent prospecting is currently considered an indispensable tool for the knowledge of the technological level in which a certain scientific research is found, since much of the technological information made available in the world is disclosed in the form of patent documents. Thus, this article aimed to conduct a study of patent technological prospecting on the use of *Humulus lupulus* (hops), a plant of great commercial and industrialinterest, with a wide range of chemical and pharmacological applications. Prospecting was carried out in two freely accessible databases. In INPI, the countries that filed the most patents were the Brazil, United Kingdom, Netherlands and the Japan, respectively while, in the EPO, China dominated the deposits. When comparing the profiles of depositors from the two databases, it was possible to observe that, in INPI, companies have mastered the technique, while in EPO, deposits from educational institutions are practically equivalent to that of companies. The results also showed that, although hops is a plant consisting of chemical substances with broad pharmacological properties, the patents filed by Brazil can still be extended, which is a potential field for future research.

Keywords: Hops; Technological prospecting; Patent database.

Resumo: A prospecção de patentes é considerada hoje como uma ferramenta indispensável para o conhecimento do nível tecnológico em que se encontra determinada pesquisa científica, pois grande parte da informação tecnológica disponibilizada no mundo é divulgada sob a forma de documentos de patente. Dessa forma, o presente artigo teve como objetivo realizar um estudo de prospecção tecnológica de patentes sobre o uso do *Humulus lupulus*, uma planta de grande interesse comercial e industrial e que apresenta uma ampla gama de aplicações químicas e farmacológicas. A prospecção foi realizada em duas bases de dados de livre acesso. No INPI os países que mais depositaram patentes foram Brasil, Reino Unido, Holanda e Japão respectivamente, já na EPO a China dominou majoritariamente os depósitos. Ao comparar os perfis dos depositantes das duas bases de dados, foi possível observar que no INPI quem tem mais registro de patentes são as empresas, enquanto que na EPO os depósitos de patentes oriundos das instituições de ensino são praticamente equivalentes ao das empresas. Os resultados também demonstraram que embora o lúpulo seja uma planta composta por substâncias químicas com amplas propriedades farmacológicas, as patentes depositadas pelo Brasil ainda podem ser ampliadas, sendo este então um campo potencial para futuras pesquisas.

Palavras-chave: Lúpulo; Prospecção tecnológica; Banco de dados de patentes.

*Departamento de Ciência e Tecnologia - DCT, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, 45208-091 Jequié-BA, Brasil

e-mail: bbnjunior@uesb.edu.br

ORCID: https://orcid.org/0000-0001-7901-8550

Rev. Virtual Quim. |Vol 12| |No. 5| |00-00| Setembro-Outubro 2020
doi.org/10.21577/1984-6835.20200097

Um estudo de prospecção tecnológica de patentes sobre *Humulus lupulus*

Vanessa N. Santana, Baraquizio B. do Nascimento Junior*

Departamento de Ciência e Tecnologia - DCT, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, 45208-091 Jequié-BA, Brasil

*e-mail: bbnjunior@uesb.edu.br

ORCID: https://orcid.org/0000-0001-7901-8550
Rev. Virtual Quim. |Vol 12| |No. 5| |00-00| Setembro-Outubro 2020
doi.org/10.21577/1984-6835.20200097

1. Introdução

2. Abordagem Metodológica

3. Resultados e Discussão

3.1. Associação das palavras-chave com CIP e CCP

3.2. Mapeamento de patentes por ano

3.3. Mapeamento de patentes por país

4. Considerações Finais

1. Introdução

As propriedades benéficas do lúpulo (*Humulus lupulus* L.) são bem conhecidas e os primeiros relatos sobre seu uso para fins medicinais remontam ao século IX.[1] Atualmente, contudo, o lúpulo é utilizado no Brasil principalmente como um agente combinado de amargor, aromatizante e conservante para a indústria cervejeira. O lúpulo é uma planta trepadeira, nativa das regiões temperadas do hemisfério norte. O gênero *Humulus* inclui três espécies, *Humulus lupulus*, *scandens Humulus* e *Humulus yunnanensis*.[2] *Humulus* pertence à família Cannabaceae e também possui propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias, efeitos inseticidas, fitoestrogênicas e relaxantes, sendo utilizado em alguns países com essas finalidades.[3] No entanto, apenas as flores das plantas femininas do *H. lupulus* possuem valor comercial, já que elas apresentam nos "cones" grande número de glândulas de lupulina, as quais contêm uma gama de substâncias químicas de interesse farmacológico.[4]

Os metabólitos secundários presentes nas glândulas de lupulina são frequentemente classificados em três frações: resinas de lúpulo, óleo de lúpulo e polifenóis de lúpulo. As resinas de lúpulo são caracterizadas por sua solubilidade em metanol frio e éter dietílico e são

posteriormente classificadas, dependendo de sua solubilidade em hexano em resinas moles e duras. Nas resinas moles encontram-se os α-ácidos e a fração β (β-ácidos). Os α-ácidos são misturas homólogas e análogas de cinco compostos, denominados de humulonas, cohumulona, adhumulona, prehumulona e poshumulona, considerados os constituintes químicos mais importantes das resinas do lúpulo.[5] As estruturas químicas dos α-ácidos majoritários estão representados na Figura 1. Já a chamada fração β das resinas moles totais pode ainda ser dividida em β-ácidos e resinas moles não caracterizadas. O grupo β-ácido é composto por lupulona e quatro congêneres: colupulona, adlupulona, prelupulona e póslupulona.[6] Suas estruturas estão representadas na Figura 2.

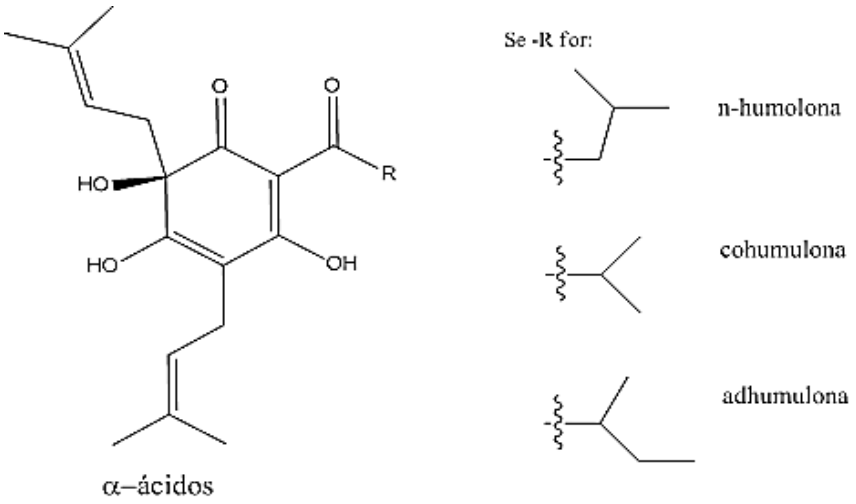


Figura 1. Estruturas químicas dos principais α-ácidos majoritários do lúpulo

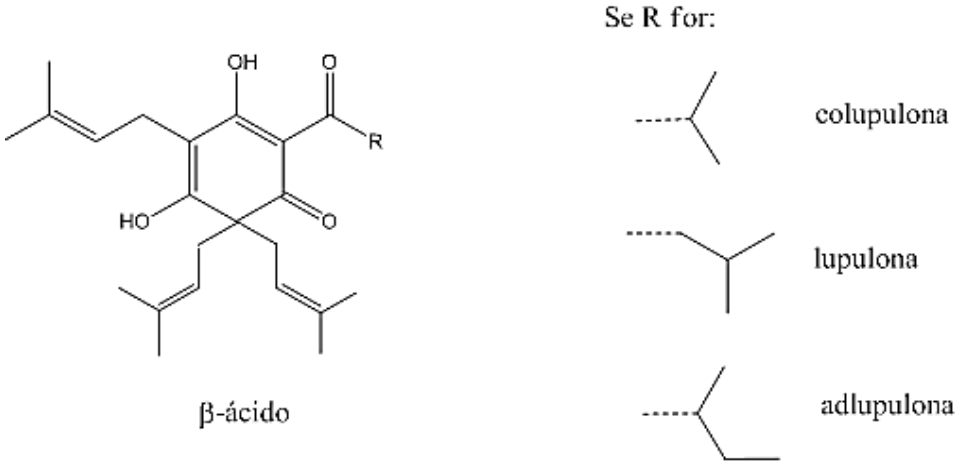


Figura 2. Estruturas químicas dos principais β-ácidos majoritários do lúpulo

As resinas duras são caracterizadas por sua insolubilidade em hexano e consistem

principalmente de chalconas e flavanonas preniladas, sendo o xanthohumol (3′-(3,3-dimetilalil)-2′,4′,4-trihidroxi-6′-metoxichalcona) um *prenilflavonoide*, o principal constituinte da resina dura (Figura 3).[7,8] O óleo de lúpulo (essencial), responsável pelo aroma característico da planta, é, por definição, a fração de lúpulo que pode ser isolada por destilação com água ou vapor d'água. Esse óleo é constituído em sua maioria por hidrocarbonetos terpênicos, com destaques para o monoterpeno β-mirceno, composto majoritário, que apresenta níveis de concentração de até 60% do total do óleo essencial e juntamente com α-humuleno, β-cariofileno e β-farneseno chegam a representar cerca de 80-90% do total do óleo essencial.[1-7] Na Figura 4 pode ser observada as estruturas químicas desses compostos majoritários presentes no óleo essencial do lúpulo.

Ao lado das resinas de lúpulo e do óleo de lúpulo, estão presentes nos cones uma mistura complexa de polifenóis, composta por ácidos carboxílicos aromáticos e flavonóides não prenilados, incluindo proantocianidinas e flavonóis glicosídeos, onde destacam-se 8-prenilnaringenina (8-PN) e o isoxanthohumol. As estruturas desses compostos podem ser visualizadas na Figura 5.

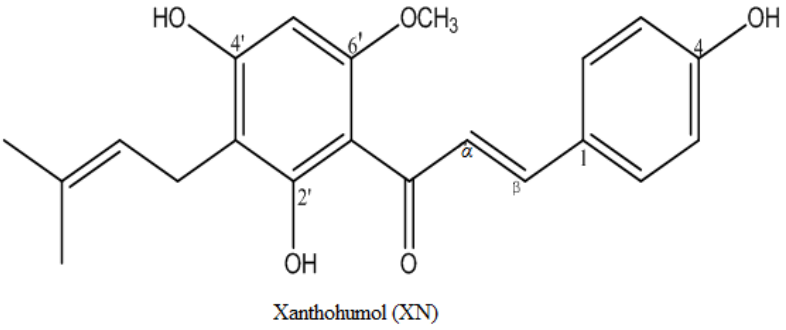


Figura 3. Estrutura química do principal constituinte da resina dura

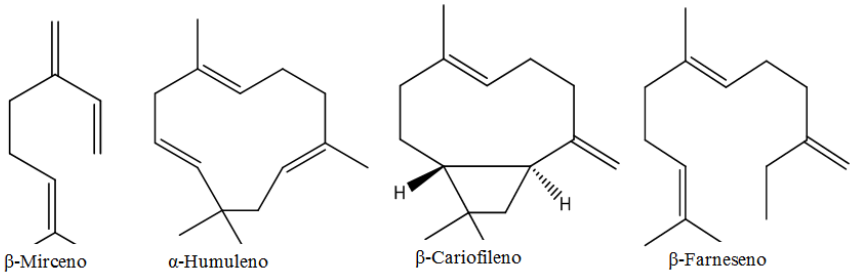


Figura 4. Estruturas de alguns terpenos presentes no óleo essencial de lúpulo

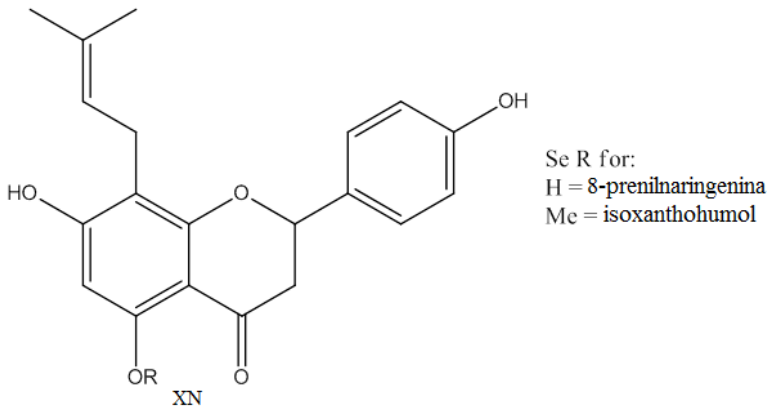


Figura 5. Estruturas dos prenilflavonóides: 8-prenilnaringenina e isoxanthohumol

O xanthohumol foi caracterizado como um agente quimiopreventivo do câncer de atuação abrangente, enquanto a 8-prenilnaringenina é considerada como o fitoestrogênio mais potente conhecido até o momento.[9-12]

Além disso, foi comprovado que alguns polifenóis presentes no lúpulo também atuam como agentes antiplaquetários, antibacterianos e antidiuréticos, demonstrando um grande potencial para novos estudos dessa planta para fins medicinais e não apenas como um componente de amargor ou aroma para a cerveja.[13-19] Assim, motivados pela necessidade de conhecer as descobertas tecnológicas que estão ocorrendo com o lúpulo, esse artigo realiza um estudo de prospecção de patentes sobre essa planta.

A prospecção de patentes é uma ferramenta importante para o pesquisador, pois fornece informações relevantes para o levantamento de dados e permite realizar o mapeamento de uma tecnologia, evidenciando seu estado atual, possibilitando, assim, que o pesquisador entenda como essa tecnologia se insere na sociedade.[20] Além disso, esse estudo investigativo é instrumento fundamental para conhecer o mercado e obter dados para um bom direcionamento de uma determinada linha de pesquisa científica, verificando sua relevância, bem como as lacunas que ainda podem ser preenchidas por novas descobertas.

Ademais, tal levantamento ainda tem como vantagem a abrangência de todos os campos tecnológicos relacionados com o objeto de interesse, possibilitando o conhecimento e o acesso a documentos de patentes nacionais e internacionais acerca do tema pesquisado. Traz, ainda, conhecimento sobre o estado atual da tecnologia em questão, onde e quem detém essa tecnologia, a visão dos gargalos tecnológicos, como também ocorrências de inovações, tendências, diversidades de soluções e oportunidades.[21,22] Diante dessas vantagens, buscou-se realizar um mapeamento tecnológico referente ao *Humulus lupulus*, verificando os tipos de patentes registradas, os números e as frequências dos depósitos, os perfis de depositantes, os

países com mais pedidos de patentes e os detentores dessa tecnologia, fornecendo, portanto, uma visão geral do desenvolvimento tecnológico relacionado a essa planta.

2. Abordagem Metodológica

O estudo de prospecção foi realizado no período de maio a agosto de 2019 e revisado no período de 16 a 29 de junho de 2020, levando em consideração os últimos 12 anos (2009 - 2020). O mapeamento foi realizado em duas bases de dados de livre acesso. Essas bases foram escolhidas devido a sua gratuidade, alcance nacional e internacional, acessibilidade e confiabilidade dos dados disponíveis:

1. Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) - essa base nacional permite a busca por patentes depositadas pelo Brasil e por outros países através do sistema de pesquisa simples ou avançada e possibilita combinar palavras-chave no título e resumo com a Classificação Internacional de Patentes (CIP). É possível também a busca de patentes expiradas ou a expirar, de acordo com os prazos estabelecidos na legislação de propriedade industrial.[23]
2. European Patent Office (EPO), também conhecida como Espacenet® - essa base possibilita acessar mais de 120 milhões de documentos de patentes de diferentes países (inclusive do Brasil), sendo um dos bancos mais completos e atualizados. É possível combinar palavras-chave em inglês no título e resumo com a CIP e também com a Classificação Cooperativa de Patentes (CCP), conhecida em inglês por Cooperative Patent Classification (CPC), permitindo maior precisão na busca e recuperação de documentos de patentes. O uso da CCP em buscas de patentes leva a resultados mais precisos e reduz o número de palavras chave necessárias.[24]

A coleta de dados foi realizada através de uma busca avançada, utilizando-se das palavras-chave lúpulo e *lupulus* e associando-as com os códigos da CIP e CCP. Esses códigos são organizados de acordo com a sua área tecnológica, classificando os pedidos de patentes pela área de interesse, tornando a busca mais específica. Foram considerados válidos os documentos de patentes que apresentassem as palavras-chave no título ou no resumo e que tivessem relação direta com o uso e/ou aplicabilidade industrial da planta. Nas patentes encontradas, foram realizadas leituras dos resumos e dos documentos na íntegra, quando disponíveis.

Todos os dados foram tabelados e transformados em gráficos com a ajuda do aplicativo Microsoft Office Excel® versão 2010.

3. Resultados e Discussão

3.1. Associação das palavras-chave com CIP e CCP

A Tabela 1 descreve o resultado da prospecção de patentes sobre a aplicação industrial do lúpulo nas bases de dados INPI e EPO. Na EPO foram encontrados 69 documentos de patentes. No INPI, por outro lado, apenas 30, totalizando, assim, 99 documentos.

Tabela 1. Número de patentes encontradas nos bancos de dados do INPI e EPO através de uma busca avançada associando as palavras-chave com os códigos da CIP e CCP

Palavras-chave	INPI	EPO	Total
lúpulo*/*lupulus*	30[b]	69[b]	99

* Operador utilizado para que o levantamento nos bancos de dados ocorra com a palavra no singular e no plural.
[b]Total de patentes válidas

Enquanto o INPI adota apenas a CIP, a EPO adota a CIP e também a CCP para classificar os seus pedidos de patentes. A classificação tem como objetivo inicial o estabelecimento de uma ferramenta de busca eficaz para a recuperação desses documentos pelos interessados, a fim de estabelecer a novidade e avaliar a atividade inventiva de divulgações técnicas em pedidos de patentes. A CCP é o sistema de classificação criado pela EPO, baseado na CIP, sendo mais detalhada. Enquanto a CIP possui em torno de 70 mil grupos, a CCP possui, aproximadamente, 200 mil grupos. Uma vez identificado o(s) grupo(s) ao(s) qual(is) o pedido de patente se refere, é fácil identificar outros pedidos de patentes relacionados com o mesmo fim.

Na CIP as áreas tecnológicas relacionadas com as patentes são divididas em oito seções, de A a H e, dentro de cada seção, há classes e subclasses, classificadas através de um sistema hierárquico. A busca avançada nessas bases, associando as palavras-chave lúpulo e *lupulus* com a CIP, resultou em documentos diretamente relacionados com a planta e a sua aplicação. Houve um enquadramento das palavras-chave em cinco seções, sendo elas: A (Necessidades Humanas), 48 documentos de patentes; B (Operações De Processamento; Transporte), 5 documentos de patentes; C (Química; Metalurgia), 38 documentos de patentes; F (Engenharia Mecânica; Iluminação; Aquecimento; Armas; Explosão), 1 documento e G (Física), 7 documentos de patentes (Figura 6).

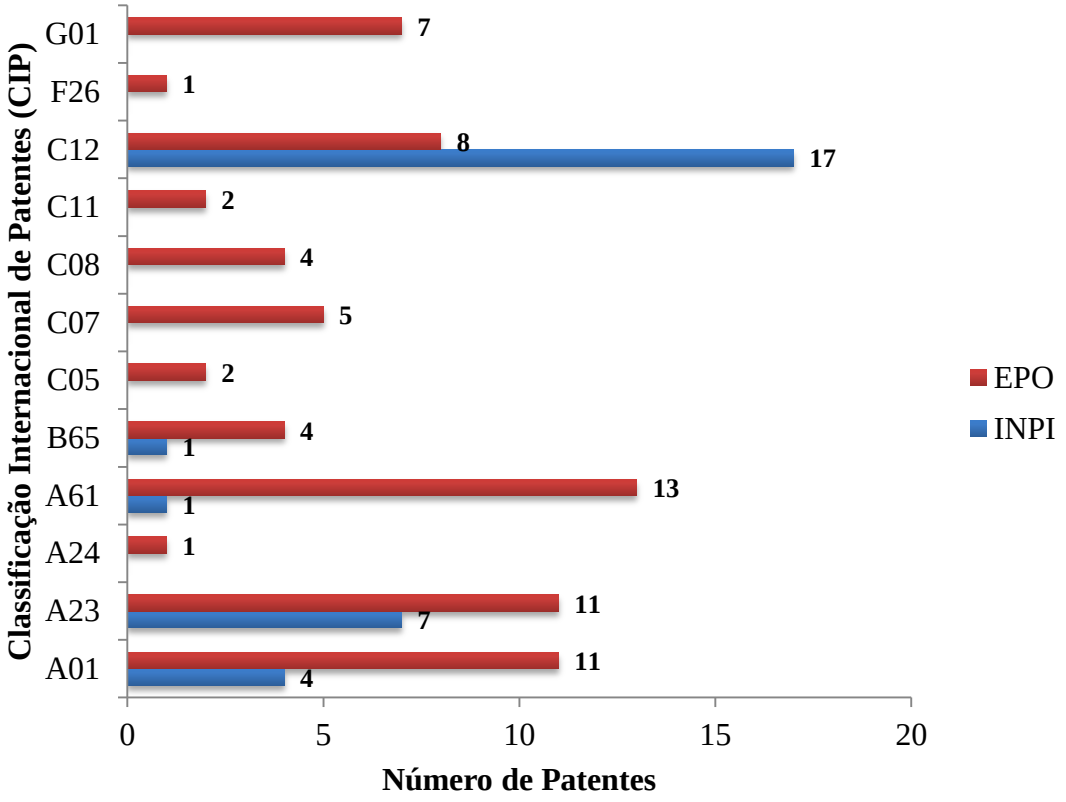


Figura 6. Distribuição do número de patentes por classe, referente às palavras-chave *lupulus* e lúpulo associados com os códigos da CIP nas bases de dados INPI e EPO. Legenda: A01-Agricultura; Silvicultura; Pecuária; Caça; Captura Em Armadilhas; Pesca; A23-Alimentos ou Produtos Alimentícios; Seu beneficiamento, não abrangido por outras classes; A24-Tabaco; Charutos; Cigarros; Artigos para fumantes; A61-Ciência Médica ou Veterinária; Higiene; B65-Transporte; Embalagem; Armazenamento; Manipulação de material delgado ou filamentar; C05-Fertilizantes; Sua fabricação; C07-Química Orgânica; C08-Compostos Macromoleculares Orgânicos; Sua Preparação ou seu processamento químico; Composições baseadas nos mesmos; C11-Óleos Animais Ou Vegetais, Gorduras, Substâncias Graxas ou Ceras; Ácidos Graxos Derivados dos mesmos; Detergentes; Velas; C12-Bioquímica; Cerveja; Álcool; Vinho; Vinagre; Microbiologia; Enzimologia; Engenharia Genética ou de Mutação; F26-Secagem; G01-Medição; Teste

Como pode ser observado na Figura 6, das cinco seções em que a pesquisa se enquadrou, as seções A e C foram as que tiveram um maior número de patentes. As classes A01, A23 e C12 obtiveram um maior número de documentos depositados tanto no INPI quanto na EPO. É possível também destacar na EPO as classes A61, C07 e G01.

No INPI, na classe C12 (17 patentes), a subclasse com maior quantidade de depósitos foi a C12C (Produção de cerveja), com 15 patentes. Na classe A23 (7 patentes), a subclasse mais citada foi A23L (Alimentos, produtos alimentícios ou bebidas não alcoólicas, seu preparo ou tratamento, p. ex. cozimento, modificação das qualidades nutritivas, tratamento físico, conservação de alimentos ou produtos alimentícios em geral), com 4 documentos de patentes. Na classe A01 (4 patentes), a subclasse mais citada foi a A01N (Conservação de

corpos de seres humanos, animais ou plantas ou partes dos; biocidas, p. ex. como desinfetantes, como pesticidas ou como herbicidas; Repelentes ou atrativos de pestes; Reguladores do crescimento de plantas), com 3 documentos de patentes.

Na EPO, os documentos de patentes ficaram concentrados nas classes A61 (13 patentes), A01 (11 patentes), A23 (11 patentes), C12 (8 patentes), C07 (5 patentes) e G01 (7 patentes). As subclasses mais citadas em cada classe foram: A61K (Preparações para finalidades médicas, odontológicas ou higiênicas), com 3 documentos de patentes e A61P (Atividade terapêutica específica de compostos químicos ou preparações medicinais), com 10 documentos de patentes; A01D (Colheita; Ceifa), com 5 documentos de patentes, A01G (Horticultura; Cultivo de vegetais, flores, arroz, frutas, vinhas, lúpulos ou algas; Silvicultura; irrigação), com 4 documentos de patentes, A01H (Novas plantas ou processos para obtenção das mesmas; Reprodução de plantas por meio de técnicas de cultura de tecidos), com 2 documentos de patentes e A23L, com 8 documentos de patentes. Na seção C, os documentos de patentes depositados estavam associados em sua maioria às subclasses C12C (Compostos acíclicos ou carbocíclicos), com 6 documento de patentes e C07C (Compostos heterocíclicos), com 2 documentos de patentes. Na seção G, destacou-se a subclasse G01N (Investigando ou Analisando materiais determinando duas propriedades químicas ou físicas), com 7 documentos de patentes.

A maioria dos documentos depositados na base de dados do INPI, na secção C, faz uso do lúpulo para fins cervejeiros. Nessas patentes, ele é citado como um ingrediente no processo de produção da bebida para desenvolvimento de cervejas com mais ou menos amargor e como realçador de aroma. Já na base de dados da EPO, as patentes ficaram concentradas na secção A, as quais dizem respeito ao uso do lúpulo para desenvolvimento de novos medicamentos, produtos odontológicos e de higiene, envolvendo seu uso para fins fitoterápicos e tratamento de transtornos psicológicos como ansiedade e distúrbios do sono.

Além da CIP, na base de dados da EPO é possível associar as palavras-chave com a CCP. Essa classificação é composta pelas oito secções da CIP, acrescidas da secção Y (Marcação geral de novos desenvolvimentos tecnológicos e Marcação geral de tecnologias transversais que abrangem várias seções da CIP), oferecendo uma classificação mais detalhada e permitindo, dessa forma, uma maior precisão na busca dos documentos de patente.

No mapeamento utilizando a CCP na base de dados EPO (Figura 7), foram encontrados 37 patentes que se enquadravam em cinco seções, sendo elas A, B, C e G. Nesse caso, apenas nas classes A01, A23, A24, A61, B65, C07, C08, C11, C12 e G01 foram encontradas

documentos com citações de uso e aplicação do lúpulo; dentre essas, as subclasses com maior número de depósitos foram: A23L e A23V (Esquema de indexação relativo a alimentos, Alimentos ou Bebidas não alcoólicas), ambas com 4 documentos de patentes, A61K, com 6 documentos de patentes e G01N (Investigação ou Análise dos materiais pela determinação de suas propriedades químicas ou físicas), com 5 documentos de patentes.

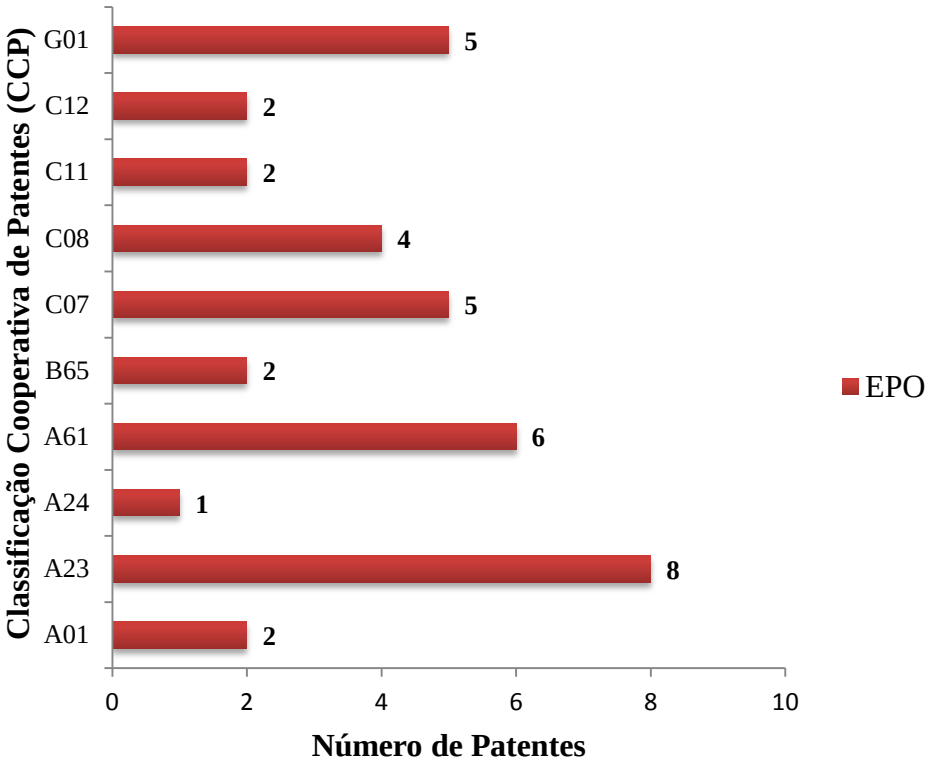


Figura7. Distribuição do número de patentes referente aos termos: *lupulus* e lúpulo associado com os códigos da CCP na base de dados EPO. Legenda: A01-Agricultura; Silvicultura; Pecuária; Caça; Captura Em Armadilhas; Pesca; A23-Alimentos ou Produtos Alimentícios; Seu beneficiamento, não abrangido por outras classes; A24-Tabaco; Charutos; Cigarros; Artigos para fumantes; A61-Ciência Médica ou Veterinária; Higiene; B65-Transporte; Embalagem; Armazenamento; Manipulação de material delgado ou filamentar; C07-Química Orgânica; C08-Compostos Macromoleculares Orgânicos; Sua Preparação ou seu processamento químico; Composições baseadas nos mesmos; C11-Óleos Animais Ou Vegetais, Gorduras, Substâncias Graxas ou Ceras; Ácidos Graxos Derivados dos mesmos; Detergentes; Velas; C12-Bioquímica; Cerveja; Álcool; Vinho; Vinagre; Microbiologia; Enzimologia; Engenharia Genética ou de Mutação; G01-Medição; Teste

O mapeamento utilizando a CIP e a CCP na base de dados EPO demonstrou uma semelhança nas características das patentes: os documentos encontrados, em sua maioria, apresentavam estudos envolvendo o uso do lúpulo para preparação e aplicação em medicina, odontologia e higiene e como inibidor da proliferação de bactérias em alimentos. Em ambos os estudos é realizada a adição de extrato de lúpulo rico em alfa-ácidos, substâncias

antioxidantes e antimicrobianas, tanto para a formulação de fármacos como conservante de alimentos. A CCP possui um grau de detalhamento maior, uma vez que a mesma traz mais uma seção (Y), dando origem a outras classes e subclasses, permitindo ampliar a classificação para novos tipos de tecnologia. Entretanto, a CCP apresenta uma limitação, visto que ainda não é adotada por todas as bases de dados. Contudo, foi importante para o nosso estudo, pois permitiu o cruzamento de dados e uma melhor interpretação dos resultados.

3.2. Mapeamento de patentes por ano

Nos últimos 12 anos, o número de documentos de patentes depositados na base de dados do INPI foi consideravelmente menor que na EPO (Figura 8), uma vez que, dentre outros motivos, a EPO é uma base internacional e abrange um maior número de países.

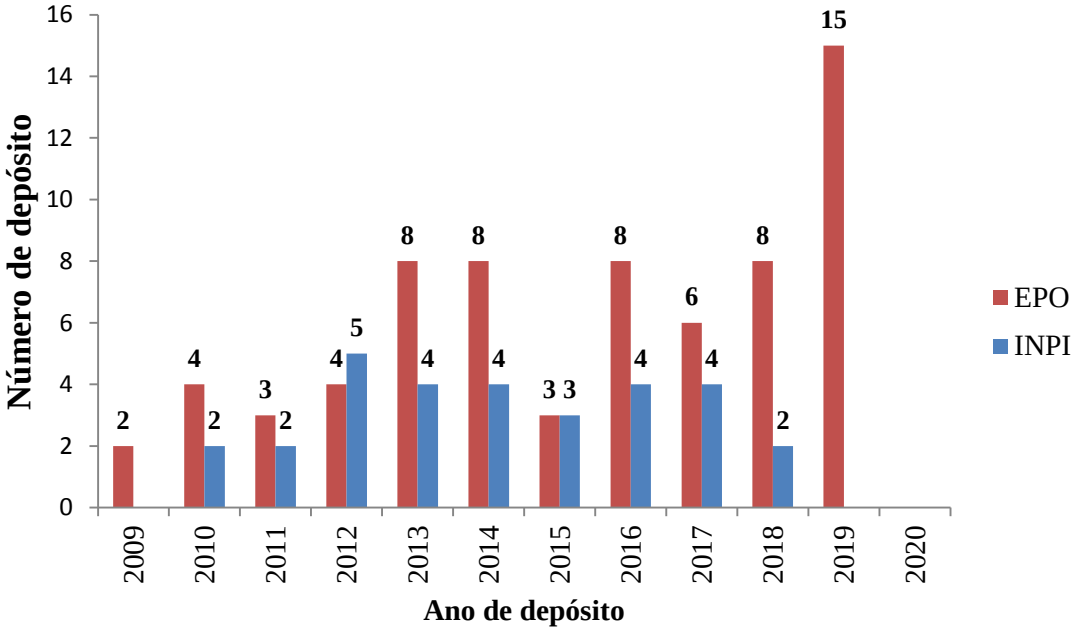


Figura 8. Resultado anual do depósito de patentes na EPO e INPI relacionadas aos termos *lupulus* e lúpulo

De acordo com a Figura 8, percebe-se certa regularidade na quantidade de depósitos no INPI ao longo dos anos, tendo no ano de 2012 ocorrido um pequeno aumento (5 patentes). Tais patentes tinham como foco o uso do lúpulo na produção de cervejas e aditivo em produtos alimentícios. Nas patentes relacionadas à produção da bebida, o lúpulo é usado como um realçador de aroma e sabor, utilizando o método denominado como “lupulação” em uma das etapas da produção. Nas patentes que fazem o uso do lúpulo como um aditivo em produtos alimentícios, suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes são destacadas.

Há uma queda no número de patentes do INPI quando comparado o ano de 2012 em relação a 2018 (60%). Essa queda provavelmente pode ser explicada por um desaquecimento na economia, o que leva a uma redução do financiamento a novas pesquisas, refletindo nessa diminuição registrada nos depósitos de patentes.

Na EPO, há uma maior variação na quantidade de depósitos, com destaque para o ano de 2019, com 15 patentes. De um modo geral, essas patentes estão voltadas para a utilização do extrato do lúpulo como aditivo em produtos medicinais para tratamento de obesidade, Alzheimer e para a limpeza de pele, principalmente na prevenção e no cuidado com acnes, auxiliando na desobstrução dos poros e no processo de inflamação.

Percebe-se que o crescimento maior no número de patentes no ano de 2019 é devido ao uso do lúpulo para outros fins que não apenas como agente de amargor e aroma para as cervejas. Além disso, o aumento observado nesse período pode ser também um reflexo de um ambiente econômico favorável, o qual reflete em investimento em pesquisas e, por conseguinte, em um aumento forte na demanda de proteção para as novas descobertas encontradas. Por outro lado, a concessão de patentes é um processo complexo, que exige exame técnico cuidadoso para assegurar que o pedido atenda a todos os requisitos estabelecidos na lei (necessários e indispensáveis para proteger tanto os depositantes como a sociedade: novidade, atividade inventiva e aplicação industrial), o que pode ter também represado alguns pedidos anteriormente solicitados e liberados neste período.

3.3. Mapeamento de patentes por país

O mapeamento de patentes por país revelou que, na base de dados do INPI, os países que mais depositaram foram: Brasil, Reino Unido, Holanda e Japão, respectivamente (Figura 9). Dos 10 documentos de patentes depositados pelo Brasil, apenas um foi depositado por uma instituição de ensino (Universidade Federal Fluminense - UFF), os demais, por empresas. Dentre as patentes brasileiras, os setores que mais se destacaram foram: cervejeiro, alimentícios e bebidas não alcoólicas (água saborizada, suplementos nutricionais, molhos de tomate e temperos), desenvolvimentos de equipamentos (secagem e compactação de lúpulo) e medicamentos (cosméticos com ações antimicrobianas e estéticas). Em relação ao Reino Unido, Holanda e Japão, as patentes depositadas eram todas originadas de empresas e os setores que mais se destacaram foram: cervejeiro (lúpulo para realçar sabor e aroma) e medicamentos (lúpulo como agente antimicrobiano e anti-inflamatório).

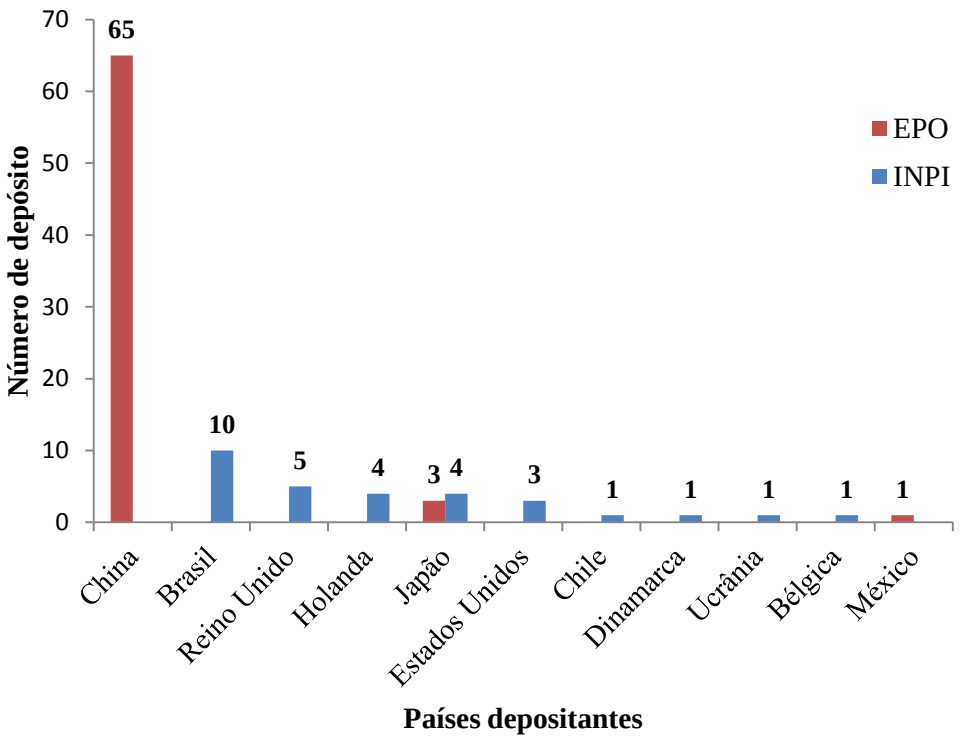


Figura 9. Distribuição dos depósitos de patentes por países de origem relacionados aos termos *lupulus* e lúpulo na base de dados EPO e INPI

Na base de dados EPO, o país que dominou majoritariamente os depósitos de patentes foi a China. De acordo com a análise, 32 desses depósitos foram realizados por instituições de ensino (universidade e centros de pesquisas) e 33 por empresas de biotecnologia, estética, farmacêutica, instrumentos analíticos e por empresas especializadas em plantio, produção, processamento e venda de lúpulo. Os depósitos de patentes da China visam desde o melhoramento no processo de cultivo do lúpulo, até a extração de compostos de interesse para futuros estudos. A China, por ser um dos maiores produtores mundiais de lúpulo, tem investido muito em pesquisas com essa planta.[25]

Ao comparar os perfis dos dois maiores depositantes das duas bases de dados, foi possível observar que, enquanto as patentes do Brasil são oriundas, em sua maioria, de empresas, os depósitos de patentes da China são tanto de instituições de ensino e centros de pesquisas como de empresas. Tal fato demonstra que, embora o lúpulo seja uma planta composta por substâncias químicas com amplas propriedades farmacológicas, o seu estudo em instituições de ensino brasileiras ainda é escasso, sendo esse um campo potencial para futuras pesquisas.

Cabe ainda ressaltar que o elevado número de patentes registradas pela China em relação aos outros países (especialmente o Brasil), reflete a política chinesa de forte demanda

de proteção à propriedade industrial e intelectual. Em 2019, a WIPO (sigla inglesa para OMPI - Organização Mundial de Propriedade Intelectual) divulgou que a China ocupa a 14ª posição entre as 20 maiores economias mais inovadoras do mundo e o 1º lugar em registros de patentes, seguido pelos Estados Unidos. Já o Brasil, maior economia da América Latina e Caribe, ficou na 24ª posição global em registros de patentes e atualmente ocupa a 66ª posição global em relação aos países considerados referência em inovação.[26]

Segundo os especialistas em propriedade intelectual, inovação e desenvolvimento, o Brasil apresenta ainda diversos gargalos (falta de investimento adequado no órgão responsável pelas análises das patentes, legislação muito restritiva quando se trata de registros de patentes oriundas de produtos naturais etc), que o impedem de melhorar a sua posição mundial em inovação. Em algumas áreas de rápida inovação tecnológica, como desenvolvimentos de novos fármacos e biotecnologia, o registro de uma patente pode demorar, em média, de 10 a 13 anos para ser concedida. Para essas áreas em que o ritmo de inovação é acelerado, é criado um ambiente de rápida obsolescência tecnológica, que traz sérios prejuízos ao país. Ainda que o registro de patente possa ser uma ferramenta de proteção ao solicitante, a demora em sua concessão é danosa para toda a sociedade.[27]

Considerações Finais

Com a prospecção tecnológica foi possível realizar um mapeamento acerca do uso e aplicação do lúpulo, identificando o cenário de inovações e tendências de estudos na área. Os documentos de patentes analisados vêm mostrando uma ampla variedade de estudos relacionados às propriedades dos compostos químicos presentes na planta, não só como um realçador de sabor e aroma em cervejas, mas também como princípio ativo para uso em medicamentos com diversas finalidades, o que desperta o interesse de empresas do ramo farmacêutico, alimentício e de bebidas não alcoólicas em geral.

A presente prospecção também mostrou um cenário crescente e inovador para futuras pesquisas científicas e de desenvolvimento de novas tecnologias para o Brasil, um país que atualmente entra no processo de cultivo de lúpulo e oferece alternativas para novos estudos, já que a mudança geográfica relacionada ao seu plantio pode favorecer o surgimento de novas características químicas e farmacológicas nessa planta.

Além disso, esse artigo mostra a importância de se realizar uma pesquisa bibliográfica em bancos de patentes para alunos de cursos tecnológicos de graduação e pós-graduação, demonstrando como o uso dessa ferramenta pode influenciar no processo de tomada de

decisão que envolve as pesquisas científicas, incentivando o desenvolvimento de novas invenções e contribuindo, assim, para ampliar a visão dos pesquisadores brasileiros.

Agradecimentos

Os autores agradecem às agências de fomento FAPESB pelo suporte financeiro para as pesquisas realizadas e a CAPES pela bolsa de mestrado concedida.

Referências Bibliográficas

[1]Moir, M. Hops-A Millennium Review. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* **2000**, *58*, 131.[CrossRef]

[2] Durello, R. S.; Silva, L. M.; Bogusz Jr, S. Química do Lúpulo.*Química Nova* **2019**, *42*, 8, 900.[CrossRef]

[3] Aydin, T.; Bayrak, N.; Baran, E.; Cakir, E. Insecticidal effects of extracts of Humulus lupulus (hops) L. cones and its principal component, xanthohumol. *Bulletin of Entomological Research* **2017**, *107*, 543.[CrossRef]

[4] Karabín, M.; Hudcová, T.;Jelínek, L.; Dostálek, P. Biologically Active Compounds from Hops and Prospects for Their Use. *Comprehensive Reviews* in *Food Science and Food Safety* **2016**, *15*, 542.[CrossRef]

[5]Almaguer, C.; Schonberger, C.; Gastl, M.; Arendt, E. K.; Becher, T. J.Humulus lupulus – a story that begs to be told. A review.Journal of the Institute of Brewing **2014**, 120, 289.[CrossRef]

[6]Karabin, M.; Hudcova, T.; Jelinek, L.; Dostalek, P. Biotransformations and biological activities of hop flavonoids.Biotechnology Advances **2015**, 33, 1063.[CrossRef]

[7]Steenackers, B.; De Cooman, L.; De Vos, D. Chemical transformations of characteristic hop secondary metabolites in relation to beer properties and the brewing process: a review. *Food Chemistry* **2015**, *172*, 742.[CrossRef]

[8]. Stevens, J. S.; Page, J. E. Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health! *Phytochemistry* **2004**, *65*, 1317.[CrossRef]

[9] Aniol, M.; Swiderska, A.; Stompor, M.; Zolnierczyk, A. K. Antiproliferative activity and synthesis of 8-prenylnaringenin derivatives by demethylation of 7-O- and 4′-O-substituted isoxanthohumols.*Medicinal Chemistry Research* **2012**, *21*, 4230.[CrossRef]

[10] Keiler, A. M.; Zierau, O.; Kretzschmar, G. Hop extracts and hop substances in treatment of menopausal complaints. *PlantaMedica* **2013**, *79*, 576.[CrossRef]

[11] Hajirahimkhan, A.; Dietz, B. M.; Bolton, J. L.; Botanical modulation of menopausal symptoms: mechanisms of action? *Planta Medica* **2013**, *79*, 538.[CrossRef]

[12]Overk, C. R.; Guo, J.; Chadwick, L. R.; Lantvit, D. D.; Minassi, A.; Appendino, G.; Chen, S. N.; Lankin, D. C.; Farnsworth, N. R.; Pauli, G. F.; Breemen, R. B. V.; Bolton, J. L. In vivo estrogenic comparisons of *Trifoliumpratense* (red clover) *Humuluslupulus*(hops), and the pure

compounds isoxanthohumol and 8-prenylnaringenin. *Chemico-Biological Interactions.* **2008**, *176*, 30.[CrossRef]

[13]Lin, M.; Xiang, D.; Chen, X.; Huo, H. Role of Characteristic Components of *Humulus lupulus* in Promoting Human Health.*Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2019**, *67*, 8291.[CrossRef]

[14]Jiang, C.H.;Sun, T. L.;Xiang, D. X.;Wei, S. S.; Li, W.Q. Anticancer Activity and Mechanism of Xanthohumol: A Prenylated Flavonoid From Hops (*Humulus lupulus* L.). *Frontiers in Pharmacology,* **2018**, *22*, 530. [CrossRef]

[15]Sotto, A.D.;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. Antiviral and Antioxidant Activity of a Hydroalcoholic Extract from *Humulus lupulus* L. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity,* **2018**, *1*,1.[CrossRef]

[16]Seliger, M. J.; Cicek, S. S.; Witt, L. T.; Martin, H. J.; Maser, E.; Hintzpeter, J. Selective Inhibition of Human AKR1B10 by *n*-Humulone, Adhumulone and Cohumulone Isolated from *Humulus lupulus* Extract. *Molecules,* **2018**, *23*, 3041.**[**CrossRef]

[17]Olas, B.; Kolodziejczyk, J.; Wachowicz, B.; Jedrejek, D.; Stochmal, A.; Oleszek, W. The extract from hop cones (Humulus lupulus) as a modulator of oxidative stress in blood platelets. *Platelets,* **2011**, *22*, 345.[CrossRef]

[18]Magalhães, P. J.; Carvalho, D. O.; Cruz, J. M.; Guido, L. F.; Barros, A. A. Fundamentals and health benefits of xanthohumol, a natural product derived from hops and beer. *Natural Product Communications,* **2009**, *4*, 591.[CrossRef]

[19] Chadwick, L. R.; Pauli, G. F.; Farnsworth, N. R.The pharmacognosy of *Humulus lupulus* L. (hops) with an emphasis on estrogenic properties. *Phytomedicine* **2006**, *13*, 119. [CrossRef]

[20] De Oliveira, L. G.; Suster, R.; Pinto, A. C.; Ribeiro, N. M.; Da Silva, R. B. Informação de patentes: ferramenta indispensável para a pesquisa e o desenvolvimento tecnológico. *Química Nova,* **2005**, *28*, 1678. [CrossRef]

[21] Speziali, M. G.; Sinisterra, R. D. Buscas de Informações Tecnológicas com Base em Dados de Patentes: Estudo de Caso dos Líquidos Iônicos no Brasil. *Química Nova,* **2015**, *38*, 1132. [CrossRef]

[22]Lima, J. A. C.; Freitas, J. R.; Silva, J. F.; Filho, M. C.; Freitas, J. C. R.O Estado da Técnica do Eugenol: Uma Prospecção Tecnológica Fundamentada em Base de Dados de Patentes e Periódicos. *Revista Virtual de Química,* **2019**, 11,*699.[CrossRef]*

[23]http://www.espacenet.com/. Acesso em: 10 de maio 2019.

[24]http:// www.inpi.gov.br/. Acesso em: 17 de maio 2019.

[25] http://www.fao.org/faostat/en/. Acesso em: 29 de junho 2020

[26]https://www.wipo.int/. Acesso em: 28 de junho de 2020.

[27] Buainain, A. M.; Souza, R. F.; Vieira, A. C. P.; Bueno, C. S.; Ferrari, V. E.; Sabino, W.; *Propriedade intelectual, inovação e desenvolvimento*: *desafios para o Brasil*, 1a ed., ABPI: Rio de Janeiro, 110p, **2018**.

Capítulo 2. Óleo essencial do *Humulus lupulus* var. Columbus: Análise da composição química, atividade antioxidante, antibacteriana e de Citotoxicidade.

Resumo: O *Humulus lupulus* L. conhecido popularmente como lúpulo, apresenta nos cones das plantas femininas quantidades significativas de lupulinas, glândulas responsáveis por sintetizar e acumular metabólitos secundários como óleos essenciais, resinas e polifenóis. O óleo essencial, constituído de 0,1 a 2% do lúpulo seco podendo variar sua composição química e potencial biológico de acordo com sua origem, modo de cultivo, região, clima, solo além do período da colheita. O objetivo desse estudo foi traçar um comparativo entre os perfis químicos dos óleos essenciais de lúpulo da variedade Columbus, cultivado no Brasil e EUA, além de potenciais biológicos dessas amostras. Neste estudo se confirmou que há diferenças na composição química e na concentração percentual de alguns compostos identificados nos óleos essenciais e que, em alguns casos, essas diferenças influenciaram nos potenciais biológicos. Os resultados indicaram que o óleo essencial de lúpulo cultivado no Brasil apresentou uma considerável diversidade de compostos voláteis, tendo o monoterpeno β-mirceno (1-39%), α-humuleno (0,10-14%), β-cariofileno (2-10%) e o sesquiterpeno α-Selineno (8-10%) entre os constituintes, além de significativa atividade antioxidante e antimicrobiana, apresentando potencial de inibição de radicais livres (>84 AA% de DPPH) e CIM de 64 a 256 µg/mL contra bactérias Gram-positivas (*S. aureus* ATCC-25923, *S. aureus* M-314, *P.aeruginosa* ATCC-25853). A atividade hemolítica não atingiu 40% de hemólise, sendo considerada de baixa citotoxicidade. Através desse resultado é evidenciada a aplicabilidade e contribuições do óleo essencial de lúpulo, variedade Columbus cultivado no Brasil, não só na indústria cervejeira, mas principalmente na formulação de medicamentos, cosméticos e aditivos em alimentos. Resultados de análises estatísticas multivariadas por ACP indicaram que há diferenças significativas nas características químicas e farmacológicas entre a variedade de lúpulo cultivado no Brasil e a variedade comercial importada dos EUA.

Palavras-chave: *Humulus lupulus* Columbus, óleo essencial, atividade antioxidante e antimicrobiana, citotoxicidade.

1. Introdução

O *Humulus lupulus* L. conhecido popularmente como lúpulo, apresenta nos cones das plantas femininas quantidades significativas de glândulas lupulinas, responsáveis por sintetizar e acumular metabólitos secundários como óleos essenciais, resinas e polifenóis (Durello *et al*., 2019; Yan *et al*., 2019). O lúpulo é comumente usado na indústria cervejeira, sendo cerca de 97% da produção destinada para fabricação de cerveja, pois atribui a bebida, aroma e amargor, além de auxiliar na conversação, atuando contra processos oxidativos e contaminações microbiológicas. Mas, em muitos estudos, o lúpulo se destacou pelo seu potencial biológico, visto que já era usado na medicina tradicional desde a Idade Média (Jeliazkova *et al*., 2018; Zawadzki *et al*., 2018).

Os metabólitos secundários do lúpulo apresentaram diversos efeitos biológicos, no entanto a sua composição química complexa afeta a análise biológica das diferentes variedades de *H. lupulus*, sendo que as funções exatas de alguns destes metabólitos ainda são desconhecidas, acredita-se então que os mesmo atuam também na proteção da planta contra pragas e patógenos (Biendl, *et al*., 2014; Ty´skiewicz, *et al*., 2018). Devido às suas propriedades fisiológicas e farmacológicas favoráveis, metabólitos secundários são usados na indústria farmacêutica como medicamentos e suplementos. Como é o caso dos óleos essenciais de lúpulo que veem se destacando em diversas pesquisas por suas propriedades biológicas, em especial, antifúngica, antioxidante e antibacteriana, sendo utilizado como substituto de conservantes sintéticos com alto potencial carcinogênico (Filip *et al*., 2016; Zhang, *et al*., 2016).

O óleo essencial de lúpulo é sintetizado nas glândulas lupulinas, constitui um teor 0,1 a 2,0% (v/p) de óleo no lúpulo seco e pode variar sua composição química e potencial biológico de acordo com o modo de cultivo, região, clima, solo além do período da colheita. É considerado óleo essencial a parte do material do lúpulo que é volátil, e apesar de ser uma fração volátil pequena, ela reúne centenas de compostos, sendo também, responsável pelo aroma característico do lúpulo (Almaguer *et al*., 2014). O óleo essencial de lúpulo apresenta uma composição complexa, é constituído por vários compostos voláteis (aromáticos), que segundo estudos recentes variam de 485 até 1000 compostos (Bruneton, 2016; Aberl & Coelhan, 2012; Olsovska *et al*., 2016).

A composição química do óleo essencial de lúpulo é formada por uma mistura de hidrocarbonetos (monoterpeno e sesquiterpeno), compostos oxigenados e compostos contendo enxofre. Dentre os hidrocarbonetos, podem ser encontrados os monoterpenos, α-pineno, β-pineno, mirceno e limoneno e os sesquiterpenos α-humuleno, farneseno, cariofileno, muuroleno e selineno que representam 80% do óleo total. Os componentes oxigenados são uma mistura de álcoois terpênicos, aldeídos, ácidos, cetonas, epóxidos e ésteres, representando cerca de 30% do óleo essencial total. A fração do óleo essencial contendo enxofre (até 1%) é constituída por tioésteres, sulfetos de cadeia linear e sulfetos de terpenóides cíclicos (Karabin *et al*., 2016; Jeliazkova *et al*., 2018).

Devido a essa composição complexa, muitas vezes a caracterização química e biológica do óleo essencial é dificultada, utilizando então conceitos como sinergismo, antagonismo, aditividade e Análise dos Componentes Principais (ACP) para explicar a bioatividade e característica química do óleo essencial de diferentes cultivares, uma vez que a

variação da composição química de óleos essenciais podem afetar sua atividade biológica (Katiki *et al*., 2017; Araújo Couto *et al*., 2019).

A ACP é uma técnica de modelagem que permite transformar um conjunto de dados complexos, com multivariáveis, em um conjunto simplificado retendo a maior parte das informações dos dados de referência, mostrando de forma clara semelhanças e diferenças entre amostras de óleo essencial de mesma variedade, porém cultivada em ambiente diferente (Li *et al*., 2018). Essa técnica aproxima as variáveis de processo e concentra uma quantidade significativa de dados correlacionados entre as variáveis (Britto, 2014).

Desse modo, este trabalho teve como objetivo traçar o perfil volátil e relacionar sua influência na bioatividade (antioxidante, antibacteriana, e citotoxicidade) do óleo essencial de lúpulo da variedade Columbus, extraído dos cones de flores (in natura) cultivado no Brasil e em pellets oriundo dos EUA. Analisando diferenças e similaridades na correlação da composição química com cultivo em condições geográficas diferentes, utilizando o ACP.

2. Materiais e métodos

2.1 Produtos químicos e reagentes

O diclorometano, mix de n-alcanos (C8-C26), Folin-Ciocalteu, DPPH (2,2- difenil-1-picrilhidrazilo), ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)6-ácido sulfônico), dimetilsulfóxido (DMSO), tween 80, droga padrão cloranfenicol, Triton X-100, Caldo *Brain Heart Infusion* (CBHI), *Brain Heart Infusion (*BHI) e Agar Sabouraud Dextrose (ASD)/(DIFCO Laboratories/USA/France), RPMI/sem bicarbonato, L-glutamina e resazurina sódica. Todos reagente e produtos químicos de grau analítico foram adquiridos da Sigma-Aldrich (São Paulo, SP, Brasil).

2.2. Amostras de Lúpulo

Os lúpulos em flor foram adquiridos diretamente com o produtor da cidade de Campo Largo-PR-Brasil (25° 27′ 32″ Sul, 49° 31′ 55″ Oeste), onde foram colhidos em abril de 2018, no período da primavera, onde a temperatura máxima era de 22,3 ºC e mínima de 13,7 ºC. Os mesmos foram secos com ventilação forçada até eliminar 75% de umidade e posteriormente embalada a vácuo e encaminhados via sedex ao laboratório para análise, sendo mantidas congeladas a uma temperatura abaixo de 0 ºC até posterior utilização. Essas amostras do lúpulo em flor foram utilizadas em três formas, in natura (OCN), seca em estufa a 35 ºC (OCE) e liofilizadas (OCL) ambas por 24 h.

Já o lúpulo do EUA industrializado (OCP) na forma de pellets (T90) foi adquirido em uma empresa fornecedora. Os lúpulos em pellets tipo 90 são produzidos através da moagem do lúpulo em moinho de martelo e a prensagem do pó num pelletizador, sendo os pellets embalados em atmosfera inerte. É denominado de pellets (T90) por conter aproximadamente 90% dos componentes não resinosos encontrados no cone.

2.3. Extração do óleo essencial

A obtenção dos óleos essenciais das amostras foi realizada pelo método de hidrodestilação, utilizando o aparelho de Clevenger modificado, onde os compostos provenientes do óleo foram arrastados por vapor de água por 3 horas. Aproximadamente 100 g do material vegetal foi triturado e colocado em um balão de fundo redondo com capacidade de 2 L, e adicionado 1,5 L de água destilada. O óleo essencial foi coletado com auxílio de pipeta de Pasteur, transferido para vials de capacidade de 1,5 mL e armazenado em freezer a uma temperatura abaixo de 0 ºC até o momento das análises. O rendimento do óleo essencial foi calculado relacionando-se a massa de óleo obtida e a massa de material vegetal utilizado na extração (% m/m).

2.4. Análise da Composição química dos óleos essenciais

A identificação da composição química do óleo essencial foi realizada através do Cromatógrafo a gás acoplado ao Espectrômetro de Massas quadrupolar (CG-EM), Shimadzu modelo GC-QP2010 (Shimadzu, Kyoto, Japão), sendo utilizada uma coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30m x 0,25mm d.i. x 0,25µm). As condições cromatográficas utilizadas foram: injetor a 220 °C e razão de split 1:40 (1,0 min), gás de arraste He a 0,6 mL/min, temperatura da interface a 280 °C e fonte de ionização por elétrons (35-350 m/z), rampa de temperatura do forno: 50 °C (1 min), com incremento de 2 °C/min até 170 °C e 10 °C/min até 270 ºC.

A identificação dos compostos foi realizada por comparação dos seus padrões de fragmentações com os espectros de massas da base de dados NIST 14 (Mass Spectral Library, 2014) presente no CG/EM; também pela comparação destes com os dados da literatura (Adams, 2007), e através de seus índices de retenção linear (IRL), calculados em relação aos tempos de retenção de uma série homóloga de n-alcanos (C8 a C26) através da Equação 1

$$LRI = 100 * \left(\frac{t_c - t_n}{t_{n+1} - t_n} + n \right) \qquad (1)$$

Onde, LRI é o índice de retenção linear, t_c é o tempo de retenção do composto de interesse, t_{n+1} é o tempo de retenção do hidrocarboneto posterior e n é o número de carbonos do hidrocarboneto anterior.

Os principais componentes dos óleos essenciais foram analisados através da porcentagem de área relativa utilizando um Cromatógrafo a gás acoplado a um Detector de Ionização em Chama (CG-DIC), Agilent 7890B. Os analitos foram separados nas mesmas condições cromatográficas já descritas, utilizando como gás de arraste H_2 a 0,75 mL/min e detector a 280 ºC.

2.5. Análise multivariada de dados dos óleos essenciais

As relações quimiotípicas entre os genótipos de lúpulo foram investigadas pela técnica multivariada conhecida como análise de componentes principais (ACP). Essa análise multivariada foi aplicada para avaliar diferenças e similaridades na composição química das amostras de óleo essencial extraída (OCN, OCE, OCL e OCP). Permitindo realizar uma análise simplificada e clara de um conjunto de dados complexos, identificando as componentes responsáveis pelas maiores variâncias entre os resultados, sem perdas significativas de informações. Para isso foram utilizados os softwares Excel® 2013 para cálculo dos parâmetros estatísticos básicos e Statistica®12 para as análises multivariadas de dados.

2.6. Redutores totais (Folin-Ciocalteau)

O conteúdo total de fenólicos foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu adaptado (Rossi; Singleton, 1965). Resumidamente, as amostras de óleo essencial de lúpulo (0,1 mL) foram misturadas a 0,1 mL de reagente Folin-Ciocalteau e 0,2 mL de solução de carbonato de sódio (4%). A mistura foi agitada em uma incubadora shaker (Solab, SL 222, Piracicaba, Brasil); após agitação, o extrato foi centrifugado (I 206, equipado com rotor ST-720m, Tecnal, São Paulo, Brasil) a 5.000 rpm a 25 ° C por 10 min e mantido a 25 ° C por 30 minutos no escuro. A absorbância da amostra foi medida por espectrofotômetro (UV-340G, Gehaka, São Paulo, Brasil) a 750 nm contra um branco (0,1 mL de reagente Folin-Ciocalteau e 0,2 mL de solução de carbonato de sódio (4%)). Soluções aquosas de ácido gálico foram usadas como padrão e sua curva de calibração foi usada para determinar o conteúdo total de compostos redutores presentes na amostra (Figura 1). Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico por 100 gramas de resíduos (mg EAG/100 g). Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

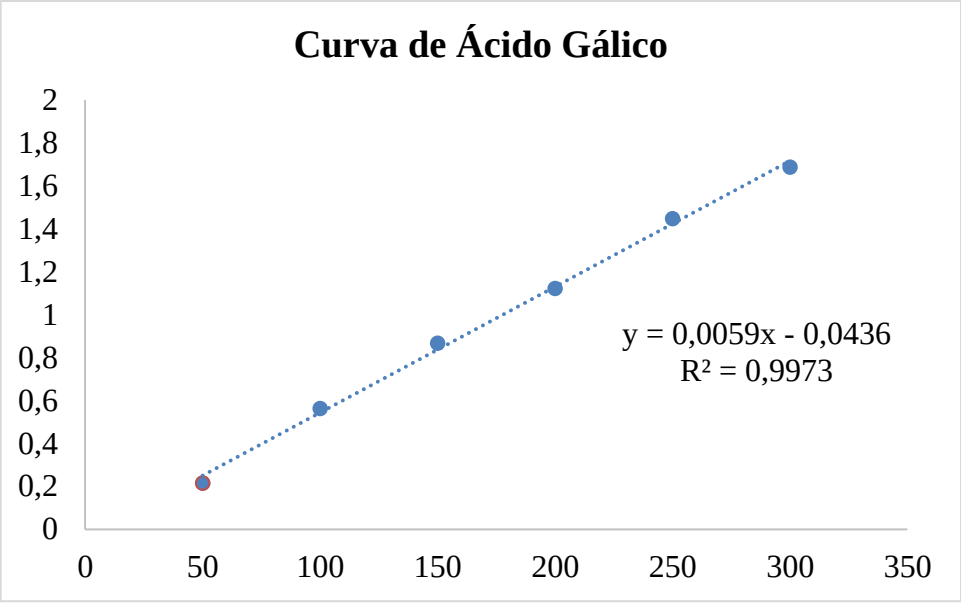


Figura 1. Curva de calibração para determinar o conteúdo total de compostos redutores

2.7. Ensaio da atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi determinada pelos métodos DPPH e ABTS. A DPPH foi estimado pela metodologia de Brand-Williams *et al.*(1995) com pequenas modificações. A solução de DPPH (0,06 mM) foi diluída com etanol para obter uma absorbância de 0,70 ± 0,02 unidades a 517 nm. As amostras de óleo essencial (0,1 mL) foram deixadas reagir com 3,9 mL da solução radical DPPH por 30 minutos no escuro, e a diminuição da absorbância da solução resultante foi observada. A absorbância da mistura de reação foi medida utilizando um espectrofotômetro (UV-340G, Gehaka, São Paulo, Brasil) a 517 nm. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. O monitoramento da diminuição da absorbância da reação entre a solução de DPPH• e a amostra foi determinada como porcentagem de inibição, sequestro ou eliminação do radical DPPH•, que pode ser obtido pela Equação 2:

$$\% \text{ de inibição do radical DPPH•} = \frac{(\text{Acontrole} - \text{Aamostra})}{\text{Acontrole}} \text{ X } 100 \qquad (2)$$

Onde, $A_{amostra}$ é a absorbância da reação entre a solução do radical DPPH• e a amostra antioxidante (óleo essencial) e $A_{controle}$ é a absorbância do radical DPPH•.

Para o teste ABTS, o procedimento seguiu o método de Rice-Evans *et al*. (1996) com pequenas modificações. O cátion do radical ABTS (ABTS +) foi gerado pela reação de 5 mL de solução aquosa de ABTS (7mM) com 88 µl de persulfato de potássio 140 mM (concentração final de 2,45 mM). A mistura foi mantida no escuro por 16 h antes do uso e depois diluída com etanol para obter uma absorbância de 0,70 ± 0,05 unidades a 734 nm

usando um espectrofotômetro (UV-340G, Gehaka, São Paulo, Brasil). Em seguida, 30 µL o óleo essencial foi adicionado em 3,0 mL de solução ABTS diluída. Após a adição de 30 µL de óleo essencial, a absorbância a 734 nm foi registrada aos 6 minutos após a mistura. Soluções etanólicas de concentrações conhecidas de Trolox foram usadas para calibração e todos os ensaios foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos em µMTrolox/g (Figura 2).

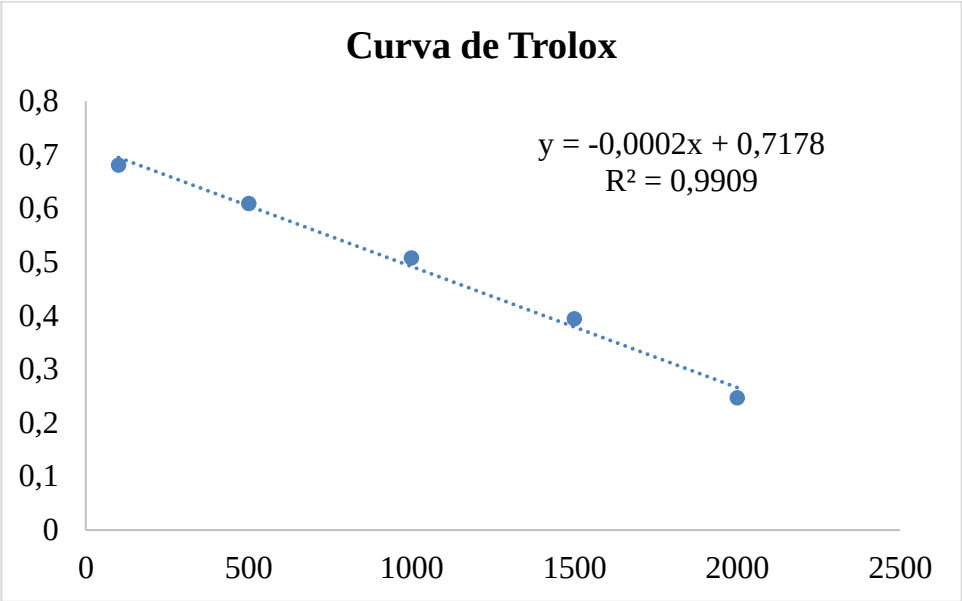


Figura 2. Curva de calibração para determinar a inibição radical ABTS

2.8. Ensaio de atividade antibacteriana

Os ensaios de atividade antibacteriana dos óleos essenciais do lúpulo Columbus foram realizados pela pesquisadora Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima no Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

As amostras do óleo essencial do lúpulo Columbus (OCN e OCP) foram solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO) a uma proporção de 5% e tween 80 a 0,02%. Em seguida, foi completado o volume final com água destilada esterilizada (q.s.p. para 3 mL) para obter uma emulsão na concentração inicial de 1024 µg/mL e diluições subsequentes até 4 µg/mL ((Cleland & Squires, 1991; Nascimento *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2014). As misturas foram agitadas durante 3 minutos em um aparelho Vortex (Fanem® Ltda., Guarulhos, SP, Brasil). As emulsões dos produtos utilizadas nos ensaios antibacterianos foram preparadas no momento da execução dos testes. Para o controle antibacteriano, foram usados como droga

padrão cloranfenicol 100/bactérias. Os produtos foram adquiridos na Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA).

2.8.1. Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados nos ensaios para avaliação da atividade antimicrobiana foram: *Brain Heart Infusion (*BHI) e Agar Sabouraud Dextrose (ASD) (Difco Laboratories Ltd, Detroit, EUA) para manutenção das cepas, e BHI e meio RPMI 1640 com L-glutamina e sem bicarbonato (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA). Os meios foram solubilizados em água destilada e esterilizados em autoclave a 121 °C, durante 15 min, de acordo com as instruções dos fabricantes.

2.8.2. Bactérias

Para os ensaios de atividade antibacteriana das amostras dos óleos, foram utilizadas as seguintes cepas:

-Bactérias: *Staphylococcus aureus* ATCC-25923, *S. aureus* LM-314, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-25853, *P. aeruginosa* ATCC-9027; *Escherichia coli* ATCC-18739, *E. coli* LM-362, *S. epidermidis* ATCC-12228, *Bacillus subtilis* ATCC-6633;

As bactérias utilizadas pertencem a MICOTECA do Laboratório de Micologia, Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF), Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba. Todas as cepas foram mantidas em *Brain Heart Infusion (*BHI)/bactérias (DIFCO Laboratories/USA/France), os quais foram preparados segundo as descrições dos fabricantes. As cepas foram mantidas em BHI à temperatura de 4 °C. As cepas foram mantidas em BHI e ASD à temperatura de 4 °C. Foram utilizados para os ensaios, repiques de 24-48 horas em ASD/BHI, incubados a 35 ± 2 °C.

2.8.3. Inóculo

Para preparação do inóculo, as colônias obtidas de culturas das cepas bacterianas foram suspensas em solução fisiológica estéril de NaCl (0,85% p/v) e ajustadas de acordo com o tubo 0,5 da escala padrão de McFarland para obtenção de 10^6 Formadoras de Colônia por mL (UFC/mL) (NCCLS, 2000; Hadacek & Greeger, 2000; Cleland & Squires, 1991; Antunes *et al*., 2006; Freire *et al.*, 2014). A quantificação do inóculo foi confirmada por meio do plaqueamento de 0,01 mL das suspensões em ASD. As placas foram incubadas a 28 ^{o}C e examinadas diariamente para a contagem das colônias, determinando o número de UFC/mL.

2.8.4. Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM)

Os ensaios de atividade antibacteriana foram realizados conforme os protocolos de Cleland e Squires (1991) e NCCLS/CLSI (2002). A determinação da CIM dos O.Es. sobre cepas de bactérias foram realizadas através da técnica da microdiluição em caldo em placa para cultura de células (TPP/ Switzerland/Europa) contendo 96 poços. Inicialmente, foram distribuídos 100 µL de RPMI/BHI duplamente concentrado nos orifícios das placas de microdiluição. Em seguida, 100 µL da emulsão dos produtos preparados duplamente concentrados, foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa e por meio de uma diluição seriada a uma razão de dois, foi obtida concentrações de 1024 µg/mL até 4 µg/mL. Por fim, foi adicionado 10 µL das suspensões das cepas de bactérias nas cavidades, onde cada coluna da placa refere-se, especificamente, a uma cepa. Paralelamente, foram realizados os controles de viabilidade de microrganismos (BHI + bactérias), esterilidade dos meios de cultura (RPMI/BHI) e controles negativos utilizando antimicrobianos padronizados, conforme cada grupo de micro-organismo. Para verificar a ausência de interferência nos resultados pelos solventes utilizados na preparação da emulsão (DMSO e Tween 80), foi feito um controle no qual foram colocados nas cavidades da microplacas o meio RPMI 1640, DMSO a 5%, Tween 80 a 2% e o inóculo bacteriano.

O ensaio foi realizado em triplicata. As placas preparadas assepticamente fechadas foram incubadas a 35 ± 2 °C durante 24-48 h e a temperatura ambiente (28 ± 2 °C) durante 7dias. No caso do ensaio com espécies bacterianas, após o tempo de incubação foram adicionados 20 µL de resazurina sódica a 0,01 % (p/v), reconhecido como indicador colorimétrico de óxido- redução para bactérias. As placas foram novamente incubadas a 35 ± 2 °C durante 24-48 h. A leitura dos ensaios foi procedida por meio da visualização da mudança de coloração nas cavidades de azul para rosa, nos ensaios com bactérias. A CIM para cada produto foi definida como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento microbiano e/ou verificado pela permanência da coloração do corante indicador de crescimento.

A atividade antibacteriana dos O.Es. do lúpulo Columbus foram interpretados e considerados como ativo ou inativo, conforme os seguintes critérios: 50-500 µg/mL = forte/ótima atividade; 600-1500 µg/mL = moderada atividade; > acima de 1500 µg/mL = fraca atividade ou produto inativo (Holetz et al., 2002; Houghton et al., 2011).

2.9. Ensaio da avaliação citotóxica

Os ensaios de atividade citotoxicidade dos O.Es. do lúpulo Columbus foram realizados pelo pesquisador Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho no Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG).

Os óleos essências do lúpulo Columbus (OCN e OCP) foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) a uma proporção de 10% e tween 80 a 0,02%. Em seguida, foram completados os volumes finais com água destilada esterilizada (q.s.p. para 3 mL) para obter uma emulsão em diferentes concentrações (50, 100, 500 e 1000 µg/mL). As emulsões foram preservados em frascos de vidro âmbar e mantidos sob refrigeração a 18 ^{o}C até o momento dos testes.

2.9.1. Eritrócitos humanos

Os eritrócitos humanos referentes aos tipos sanguíneos A, B e O foram oriundos de doadores saudáveis. Estes foram doados pelo Hospital Universitário da Universidade Federal de Campina Grande (HU-UFCG-PB-Brasil). A manipulação e o descarte dos eritrócitos foram realizados de acordo com as Normas de Segurança da referida unidade. O estudo foi aprovado pelo Comitê de ética em pesquisas com seres humanos do Centro Universitário de Patos (UNIFIP-Patos-PB-Brasil), sob o número de Protocolo 2.373.249.

2.9.2. Avaliação do potencial hemolítico em eritrócitos humanos

Amostras de sangue humano A, B e O foram misturadas com NaCl 0,9 % na proporção de 1:30 e centrifugadas a 2500 rpm durante 5 minutos para obtenção dos eritrócitos. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes e, o sedimento da última centrifugação ressuspenso em NaCl 0,9% para obter uma suspensão a 0,5%. As amostras dos óleos essênciais do lúpulo Columbus em diferentes concentrações (50, 100, 500 e 1000 ug/mL) foram adicionadas a 2 mL da suspensão de eritrócitos para um volume final de 2,5 mL. Uma suspensão de eritrócitos foi utilizada como controle negativo (0 % de hemólise) e uma suspensão de eritrócitos acrescida de Triton X-100 a 1% como controle positivo (100 % de hemólise). Após isso, as amostras foram incubadas por 1 hora à 22 ± 2 ºC sob agitação lenta e constante. Decorrido este tempo as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm durante 5 minutos e a hemólise quantificada por espectrofotometria em comprimento de onda de 540 nm (Rangel et al., 1997). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

2.9.3. Análise estatística

Todas as análises e testes foram realizados em triplicata, onde os dados foram tratados por regressão linear simples através do método one-way ANOVA, bem como por meio da utilização do *teste t de Student*. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando apresentarem $p<0,05$. A análise estatística foi feita utilizado o software GraphPadPrism5.0®.

3. Resultados e discussão

3.1- Composição química dos óleos essenciais do lúpulo Columbus

O rendimento de óleo essencial do lúpulo obtida por hidrodestilação para o lúpulo em flor in natura (OCN) e em pellets (OCP) foi de 0,255% e 1,26% respectivamente. Já as amostras em flor seca em estufa (OCE) e liofilizada (OCL) foram abaixo de 0,2%. De acordo com a literatura, cones de lúpulo seco contêm de 0,1–2% (v/p) de óleo essencial (Bruneton, 2016; Aberl & Coelhan, 2012). O baixo rendimento do óleo essencial extraído das amostras (OCN, OCE e OCL), em relação com óleo extraído do lúpulo na forma peletizada (4x maior) é devido a sua forma peletizada, ondo há uma maior concentração de cones prensados e consequentemente mais glândulas lupulinas, onde são sintetizados e armazenados esses metabólicos secundários.

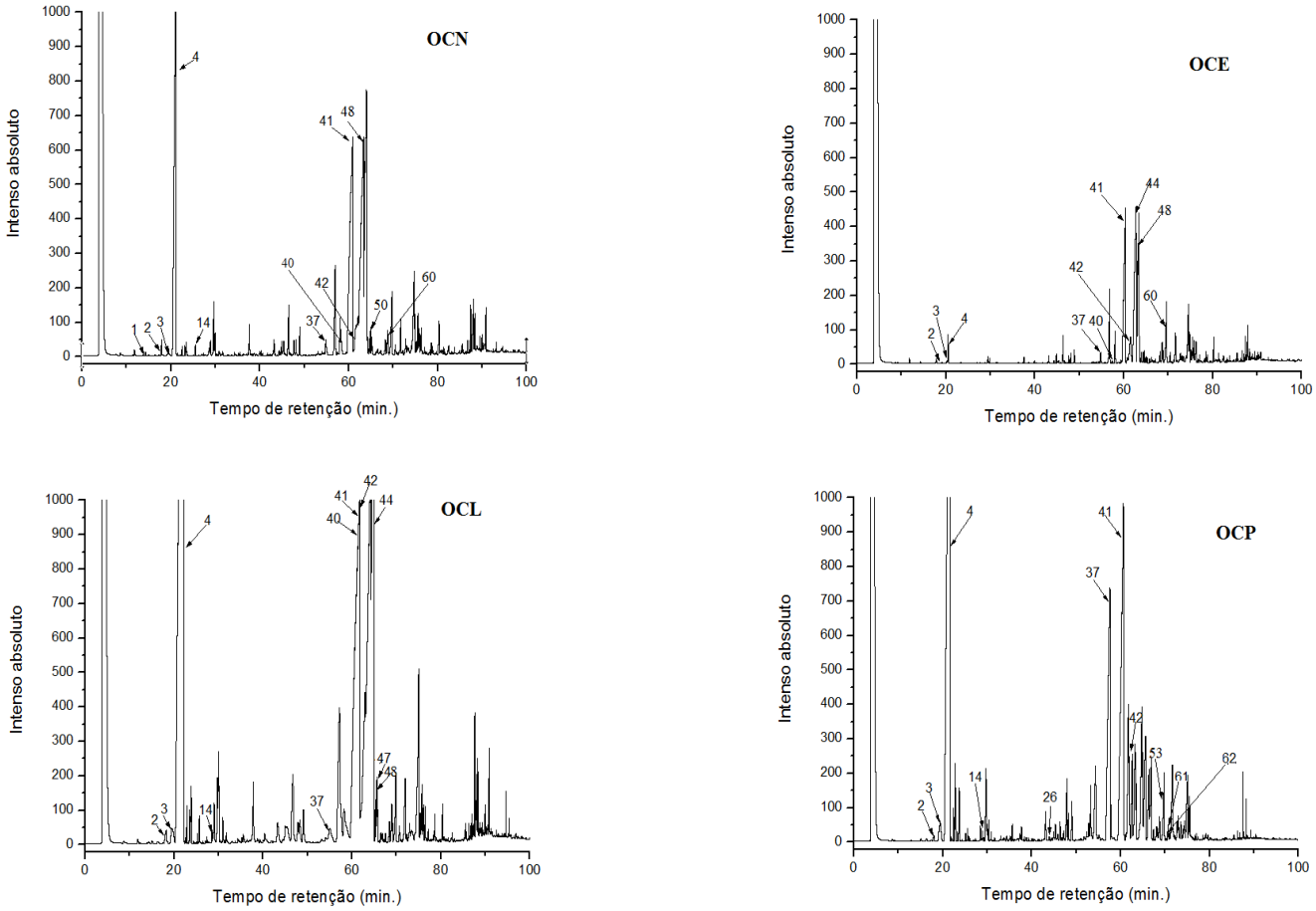


Figura 3. Cromatogramas de CG-DIC das amostras do óleo essencial do lúpulo Columbus (atribuições e identificação dos picos consulte a Tabela 1).

Foram identificados por cromatografia gasosa (CG-EM e CG-DIC) um total 85 compostos para um total de 4 amostras de óleo essencial (OCN, OCE, OCL e OCP), dentre eles, hidrocarbonetos monoterpenos, monoterpenos oxigenados, hidrocarbonetos sesquiterpenos, sesquiterpenos oxigenados, diterpenos oxigenados e outros compostos contendo oxigênio, sendo resultados compatíveis com estudos anteriores (Gonçalves *et al.*, 2014; Praet et al. 2015; Salanţă *et al*., 2015). Desses compostos, 57 foram identificados na OCN, 55 compostos na OCL, 46 compostos na OCE, e 35 compostos na OCP (Tabela 1).

As áreas de pico dos cromatogramas obtidos por CG-DIC foram usados para detectar diferenças entre as 4 amostras de óleo essencial. A Figura 3 mostra alguns exemplos de cromatogramas obtidos das amostras estudadas. Os voláteis identificados com concentração acima de 0,01% em todas as amostra de óleo essencial (4 amostras) foram: α-Pineno; β-Pineno; β-Mirceno; Limoneno; Linalol; 2-Undecanona; Geraniato de metila; *α*-Copaeno; β-Cariofileno; α-Humuleno; (*E*)-*β*-Farneseno; *β*-Selineno; Oxido de cariofileno; *β*-Eudesmol e;

Neointermedeol. Esses compostos são muito importantes, devido o seu odor característico, sendo alguns utilizados como marcadores de aroma e amargor, como por exemplo, Mirceno, β-Cariofileno, Humuleno e Linalol (Tabela 1) (Aberl & Coelhan, 2012; Bocquet *etal*, 2018; Leonardi*et al*., 2013).

Os compostos descritos na literatura como majoritários no óleo essencial de lúpulo (β-mirceno, α-humuleno, β-cariofileno e β-farneseno), foram identificados em todas as amostras (Almaguer *et al*., 2014). Os monoterpenos β-mirceno, α-humuleno e β-cariofileno são encontrados na concentração de 20-37%, 10-22% e 7-12% na variedade Columbus respectivamente, a alta concentração percentual desses monoterpenos, assim como baixos níveis de β-farneseno são fatores discriminantes para cultivares de lúpulo amargo. Analisando os perfis cromatográficos dos OEs estudados percebe-se um alto teor de β-mirceno, OCN (20,9%), OCL (36,0%) e OCP (37,1%) e altos níveis de β-farneseno (15-20%) nas amostras OCN e OCL, sendo as amostras de óleo do lúpulo brasileiro (OCN e OCL) de duplo sentido (aromática e amarga), e a amostra OCP (pellets) de amargor mais aventuado como a variedade Nelson Sauvin que apresenta mesma característica de composição química. Já a amostra OCE apresenta baixos níveis de β-mirceno (1,02%) em relação ao alto nível de β-farneseno (20,4%), atribuindo a essa amostra um perfil mais aromático, assim como a variedade Saaz, que é caracterizada com baixo nível de β-mirceno e alto de β-farneseno (Gros *et al*, 2011, Hopsteiner, 2011; Hopunion, 201; Leonardi*et al*., 2013).

Os baixos níveis de α-humuleno e β-cariofileno nas amostras OCN, OCL e OCE pode ter sido ocasionada pela degradação antes ou durante a extração do óleo essencial. O mesmo não ocorreu com a amostra OCP, pois a forma peletizada do lúpulo tem a capacidade de manter uma melhor estabilidade dos compostos, evitando perdas e degradação, uma vez que o mesmo tem como finalidade agregar sabor e aroma específico a cerveja (Salanţă *et al*., 2015).

Tabela 1. Composição química do óleo essencial de lúpulo Columbus.

	Composto	$IR_{Lit.}$	IR_{Exp}	Área% OCN	Área% OCL	Área% OCE	Área% OCP
1	Acetato de Isoamila	**863-901**	885	0,08	-	-	-
2	*α*-Pineno	**932–940**	945	0,32	0.26	0.18	0.11
3	*β*-Pineno	**975–981**	968	0,17	0.47	0.09	0.74
4	Mirceno	**988–992**	990	20,9	39.4	1.02	37.1
5	Isobutirato de isoamila	**1007-1021**	1004	0,10	0,05	-	0,23
6	Isobutirato de 2-metilbutila	**1014-1022**	1010	-	0,17	-	0,23
7	Heptanoato de metila	**1013-1028**	1017	-	0,21	-	
8	Limoneno	**1016-1030**	1020	0,22	0.31	0,10	0.56
9	*β*-Ocimeno	**1023-1048**	1044	0,15	0.17	-	0.08
10	*p*-Menta-2,4(8)-dieno	**1055-1090**	1055	-	0,01	-	-

11	6-Metil-heptanoato de metila	**1068-1070**	1069	-	0,06	-	0,12
12	2-Nonanona	**1070-1099**	1085	0,34	0,08	-	-
13	Linalol	**1086-1101**	1090	1,00	0.53	0.25	1.11
14	Nonanal	**1101-1106**	1098	0,34	0,17	0.15	-
15	Isovalerato de Amila	**1106-1141**	1096	-	-	-	0.16
16	Caprilato de metila	**1109-1138**	1128	-	0.01	-	-
17	Isobutirato de hexila	**1134-1156**	1149	-	0.03	-	-
18	*α*-Terpineol	**1150-1203**	1183	-	0.02	0.17	-
19	2-Decanona	**1188-1201**	1187	0,52	0.70	0.18	-
20	2-Decanol	**1186-1209**	1197	-	0.03	-	-
21	Decanal	**1195-1228**	1207	0,10	0.07	-	-
22	Geraniol	**1230-1276**	1241	-	-	-	0.45
23	Nonanoato de metila	**1227-1243**	1246	-	0.45	0.23	-
24	*β*-Geranial	**1264-1278**	1264	0,05	0.11	0.07	-
25	2-Undecanona	**1272-1305**	1289	1,14	1,29	1,18	0.20
26	2-Undecanol	**1286-1311**	1300	-	-	0,07	-
27	(*Z*)-4-Decenoato de metila	**1289-1291**	1304	0,49	-	-	0,99
28	Undecanal	**1304-1316**	1304	0,25	-	-	-
29	Geraniato de metila	**1315-1326**	1320	0,23	0.46	0.47	0,50
30	*α*-Copaeno	**1372–1394**	1377	0,06	0.38	0,06	0,82
31	Acetato de geranila	**1353-1398**	1384	-	-	-	0.09
32	2-Dodecanona	**1380-1396**	1389	0,46	-	0.45	-
33	β-Cariofileno	**1408-1425**	1414	2,66	3.71	4.24	9.85
34	β-Copaeno	**1400-1437**	1424	-	0.96	0.08	0.35
35	*trans*-*α*-Bergamoteno	**1431-1452**	1431	1,23	1.40	1.49	-
36	Humuleno	**1446-1482**	1441	0,10	0.73	0,12	14.4
37	(*E*)-*β*-Farneseno	**1451-1475**	1460	19,37	15,9	20,4	3.44
38	γ-Selineno	**1473-1485**	1474	1,11	0,42	3,8	
39	Propanato de geranila	**1444-1479**	1476	-	-	-	1.28
40	γ-Muuroleno	**1451-1488**	1478	-	-	-	0,06
41	*β*-Selineno	**1456-1527**	1487	14,30	0,45	19,0	2.02
42	Eremofileno	**1468-1495**	1497	5,66	9,80	-	0,64
43	α-Selineno	**1475-1530**	1499	8,30	9,90	10.3	-
44	*α*-Muuroleno	**1447-1522**	1507	0,15	-	-	-
45	*β*-Bisaboleno	**1488-1536**	1508	0,26	-	0,38	-
46	*α*-Farneseno	**1473-1538**	1511	0,40	0,20	0,39	-
47	γ-Cadinene	**1469-1543**	1515	0,27	-	0,39	2,48
48	Isobutirato de geranila	**1491-1518**	1517	-	-	-	2,45
49	*α*-Panasinseno	**1518-1577**	1519	0,12	0,22	0.25	-
50	δ-Cadinene	**1480-1562**	1522	-	0,39	0.19	1,47
51	*α*-Cadineno	**1514-1546**	1536	0,19	0.09	0.43	-
52	3,7-Selinadieno	**1538-1542**	1541	-	-	-	0,10
53	Dendrolasina	**1560-1582**	1571	0,25	-	0,36	-
54	Oxido de cariofileno	**1577-1583**	1577	1,86	1.00	4.11	1,35
55	Epóxido de humuleno II	**1606-1615**	1598	-	-	-	1,44
56	2-Tetradecanona	**1595-1600**	1600	0,88	0.76	0.46	-

57	Ledol	**1550-1616**	1608	-	-	1.48	-
58	Globulol	**1552-1623**	1613	0,13	-	-	-
59	Epóxido de alloaromadendreno	**1629-1655**	1625	-	-	0,67	-
60	*epi*-Cubenol	**1611-1638**	1627	-	-	-	0.22
61	T-Cadinol	**1614-1652**	1636	-	0.22	0.37	0.24
62	*β*-Eudesmol	**1638-1684**	1648	0,69	0.26	0.29	1,16
63	α-Cadinol	**1630-1677**	1649		-	-	0,24
64	Neointermedeol	**1648-1653**	1654	2,66	3.17	4.08	0.06
65	*β*-Bisabolol	**1669-1672**	1671	0,60	-	-	-
66	Câmfora junípera	**1651-1709**	1682	-	0.08	-	-
67	2-Petadecanona	**1682-1713**	1701	0,05	0.03	0,11	-
68	*trans*-Farnesol	**1667-1735**	1718	0,13	-	0.23	-
69	Benzoato de etilhexila	**1735**	1734	-	0,02	-	-
70	*cis*-Farmesol	**1673-1738**	1742	-	0,29	-	-
71	α-Ciperona	**1710-1771**	1761	0,23	-	0.19	-
72	Palmitato de metila	**1900-1939**	1919	0,42	0,16	0.10	-
73	*m*-Canforeno	**1944-1960**	1954	0,11	0,07	0,04	-
74	Ácido palmítico	**1951-2010**	1965	1,40	0,09	0,07	-
75	(E,Z)-Linalol geranila	**2010-2034**	1986	0,11	0,03		
76	Palmitato de etila	**1987-2013**	2008	0,03	0,06	0.14	-
77	Ácido graxo sat. não identificado	-	2012	0,08	-	-	-
78	Ácido graxo sat. não identificado	-	2024	0,08	0.02	-	-
79	Pseudo Fitol	**2083-2148**	2063	0,03	0.03		
80	Linoleato de metila	**2075-2110**	2092	0,18	0.21	0.07	-
81	Linolenato de metila	**2047-2125**	2119	0,23	0.03	0,08	-
82	Geranilgeraniol	**2201-2201**	2198	0,08	-	-	-
83	Poliisopreno não identificado (NI) de MM 290	-	2254	0,15	-	-	-
84	Poliisopreno não identificado (NI)	-	2385	0,07			
85	Hidrocarboneto C-26 NI	-	2492	0,03	-	-	-

IR^{Exp}= Os índices de retenção foram medidos experimentalmente usando séries homólogas de n-alcanos (C6 – C26) na coluna DB-5;
$IR^{lit.}$ = Adams, R.P. (2007).
Área% = A porcentagem foi obtida pela área de pico do DIC

Foram encontradas também concentrações significativas dos sesquiterpenos selinene (α e β) nas frações de óleo de lúpulo cultivado no Brasil (OCN, OCL e OCE), comumente encontrados em variedades de fontes vegetais e já relatador em cultivares de lúpulo, atribuindo um suave aroma picante e balsâmico. Alguns álcoois foram identificados nas amostras, incluindo o neointermedeol e o linalool o mais abundante álcool terpênico de aroma verde floral, com notas de limão e lavanda, exceto na OCE. (Ascrizzi *et al*, 2020; Gros *et al*, 2011; Gonçalves *et al*, 2012; Matsui *et al*., 2013).

As diferenças na composição das amostras devem-se ao fato de apresentarem colheita, processo de secagem, forma de armazenamentos e geografia diferentes (Almaguer *et al*.,

2014).O lúpulo de origem do EUA possui certa vantagem, pois na forma peletizada é possível preservar um maior nível da atividade original do lúpulo, no entanto, nessa fração de óleo essencial (OCP) foi identificado um menor número de compostos do que no lúpulo de origem brasileira, uma vez que, durante o processo de peletizaçao os cones de lúpulo processado (pó), são prensados, havendo aumento de temperatura e a degradação de alguns voláteis (Koetter & Biendl, 2010).

Dentre os compostos encontrados nas amostras de óleo essencial de lúpulo, alguns apresentam grande potencial biológico já relatado na literatura, como é o caso dos terpernos: α-pineno (ação repelente), β-pineno (efeitos antimicrobianos altos/médios contra as bactérias Gram-positivas), β-mirceno (alta atividade antimicrobiana e boa atividade repelente), α-humuleno (atividade antimicrobiana média contra as bactérias Gram-positivas e importante propriedade anti-inflamatória), β-cariofileno (repelente contra A. aegypti e alta atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas e importante propriedade anti-inflamatória) e Linalol (antileishmaniose, antimicrobiano, ações hipnóticas, hipotérmicas, bradicárdicas e sedativas). Conferindo a esses óleos um importante valor bioativo, podendo ser de alto ou baixo potencial de acordo com os níveis nesses compostos encontrados ou o efeito de sinergismo (Bocquet *et al*, 2018; Camargo & Vasconcelos, 2014; Gonçalves *et al*, 2012).

3.2 Análise multivariada de dados dos óleos essenciais

Para avaliar a correlação entre os dados obtidos na identificação dos 70 compostos em 4 amostras de óleo essencial, uma ferramenta estatística multivariada muito eficiente chamada Análise de Componentes Principais foi aplicada para avaliar o comportamento das amostras e variáveis.

A PCA é uma técnica amplamente utilizada na busca de padrões de comportamento e pode ser utilizada de forma satisfatória para auxiliar na interpretação de informações de um grande número de dados, além de demonstrar tendências significativas que não são facilmente observadas em forma de tabelas, principalmente quando trata-se de informações químicas da análise cromatográfica. Uma característica do PCA é que ele reduz a dimensionalidade dos dados experimentais ao agrupar as informações correlacionadas em um novo componente (Brereton, 2003).

Inicialmente foi avaliada a área relativa dos picos cromatográficos de 85 compostos nas 4 amostras analisadas. Gráficos de PCA foram construídos para verificar se todos os compostos contribuíram para a formação dos clusters. No entanto, verificou-se que havia compostos que não contribuíram para a distinção das amostras. Portanto, após essa avaliação

preliminar 70 compostos que apareceram em no máximo 3 amostras diferentes de frações de óleo essencial foram selecionados para inclusão no tratamento por PCA. A Tabela 2 mostra os resultados obtidos para a área relativa dos picos das amostras de óleo essencial.

Tabela 2. Valores para as correlações entre componentes principais e variáveis do óleo de lúpulo.

Composto	PC1	PC2	PC3
AcIso	0.4983	**-0.7612**	-0.4152
Isob	-0.2506	-0.0806	**-0.9647**
Isob2	**-0.6471**	0.5949	-0.4767
HepM	0.2341	**0.8493**	-0.4732
â-Oci	-0.2513	-0.0704	**-0.9654**
p-Men	0.2341	**0.8493**	-0.4732
6-Met	**-0.6693**	0.5760	-0.4693
2-Non	**0.6359**	0.0659	**-0.7689**
Non	**0.9799**	0.1915	0.0554
IsoaV	**-0.9835**	-0.1641	-0.0766
CapM	0.2341	**0.8493**	-0.4732
IsobH	0.2341	**0.8493**	-0.4732
á-Ter	0.4202	**0.7999**	0.4285
2-Dec	**0.9832**	0.1679	0.0710
2-Deca	0.2341	**0.8493**	-0.4732
Dec	**0.6309**	0.0962	**-0.7699**
Ger	**-0.9835**	-0.1641	-0.0766
NonM	0.4202	**0.8023**	0.4240
â-Ger	**0.9812**	0.1716	0.0880
2-Unde	0.2511	0.0760	**0.9650**
(Z)-4-D	-0.4173	**-0.8024**	-0.4266
Und	0.4983	**-0.7612**	-0.4152
AcGer	**-0.9835**	-0.1641	-0.0766
2-Dod	**0.6490**	-0.5937	0.4757
â-Cop	-0.4983	**0.7665**	0.4051
á-Berg	**0.9823**	0.1735	0.0701
ã-Sel	**0.9814**	0.1780	0.0712
Pger	**-0.9835**	-0.1641	-0.0766
ã-Muu	**-0.9835**	-0.1641	-0.0766
Erem	-0.2497	-0.0700	**-0.9658**
á-Sel	**0.9828**	0.1714	0.0686
á-Muu	0.4983	**-0.7612**	-0.4152
â-Bis	**0.6502**	-0.5976	0.4693
á-Far	**0.9836**	0.1683	0.0655
ã-Cad	-0.2314	**-0.8531**	0.4676
IsGer	**-0.9835**	-0.1641	-0.0766
á-Pan	**0.9838**	0.1649	0.0702
ä-Cad	-0.5104	**0.7570**	0.4080

á-Cad	**0.9833**	0.1679	0.0703
3,7-Sel	**-0.9835**	-0.1641	-0.0766
Dend	**0.6491**	-0.5940	0.4753
Ehum	**-0.9835**	-0.1641	-0.0766
2-Tetr	**0.9843**	0.1666	0.0579
Led	0.2511	0.0760	**0.9650**
Glob	0.4983	**-0.7612**	-0.4152
Eall	0.2511	0.0760	**0.9650**
T-Cad	-0.5004	**0.7633**	0.4087
á-Cad	**-0.9835**	-0.1641	-0.0766
â-Bisa	0.4983	**-0.7612**	-0.4152
CâJ	0.2341	**0.8493**	-0.4732
2-Pet	**0.9813**	0.1734	0.0833
trans-F	**0.6490**	-0.5936	0.4758
Benz	0.2341	**0.8493**	-0.4732
cis-Farm	0.2341	**0.8493**	-0.4732
á-Cipe	**0.6475**	-0.5886	0.4840
Pa1M	**0.9828**	0.1691	0.0746
m-Can	**0.9818**	0.1737	0.0769
Apal	**0.9819**	0.1723	0.0789
(E,Z)-Lin	**0.6336**	0.0804	**-0.7695**
PalAE	**0.9821**	0.1718	0.0770
AG1	0.4983	**-0.7612**	-0.4152
AG2	**0.6340**	0.0777	**-0.7694**
PseF	**0.6341**	0.0770	**-0.7694**
LinAM	**0.9832**	0.1665	0.0749
LinNM	**0.9830**	0.1680	0.0739
Geran	**0.4983**	**-0.7612**	-0.4152
Poliis1	0.4983	**-0.7612**	-0.4152
Poliis2	0.4983	**-0.7612**	-0.4152
epi-C	**-0.9835**	-0.1641	**-0.0766**
Hidro	0.4983	**-0.7612**	-0.4152

AcIso (Acetato de Isoamila); Isob (Isobutirato de isoamila); Isob2 (Isobutirato de 2-metilbutila); HepM (Heptanoato de metila); â-Oci (*β*-Ocimeno); p-Men (*p*-Menta-2,4(8)-dieno); 6-Met (6-Metil-heptanoato de metila); 2-Non (2-Nonanona); Non (Nonanal); IsoaV (Isovalerato de Amila); CapM (Caprilato de metila); IsobH (Isobutirato de hexila); á-Ter (*α*-Terpineol); 2-Dec (2-Decanona); 2-Deca (2-Decanol); Dec (Decanal); Ger (Geraniol); NonM (Nonanoato de metila); â-Ger (*β*-Geranial); 2-Unde (2-Undecanol); (Z)-4-D ((*Z*)-4-Decenoato de metila); Und (Undecanal); AcGer (Acetato de geranila); 2-Dod (2-Dodecanona); â-Cop (β-Copaeno); á-Berg (*trans-α*-Bergamoteno); ã-Sel (□-Selineno); Pger (Propanato de geranila); ã-Muu (□-Muuroleno); Erem (Eremofileno); á-Sel (α-Selineno); á-Muu (*α*-Muuroleno); â-Bis (*β*-Bisaboleno); á-Far (*α*-Farneseno); ã-Cad (□-Cadinene); IsGer (Isobutirato de geranila); á-Pan (*α*-Panasinseno); ä-Cad (δ-Cadinene); á-Cad (*α*-Cadineno); 3,7-Sel (3,7-Selinadieno); Dend (Dendrolasina); Ehum (Epóxido de humuleno II); 2-Tetr (2-Tetradecanona); Led (Ledol); Glob (Globulol); Eall (Epóxido de alloaromadendreno); T-Cad (T-Cadinol); á-Cad (α-Cadinol); â-Bisa (*β*-Bisabolol); CâJ (Câmfora junípera); 2-Pet (2-Petadecanona); trans-F (*trans*-Farnesol ou isômero); Benz (Benzoato de etilhexila); cis-Farm (*cis*-Farmesol); á-Cipe (α-Ciperona); Pa1M (Palmitato de metila); m-Can (*m*-Canforeno); Apal (Ácido palmítico); (E,Z)-Lin ((E,Z)-Linalol geranila); PalAE (Palmitato de etila); AG1(Ácido graxo sat. não identificado); AG2 (Ácido graxo sat. não identificado); PseF (Pseudo Fitol); LinAM (Linoleato de metila); LinNM (Linolenato de metila); Geran (Geranilgeraniol); Poliis1 (Poliisopreno não identificado

(NI) de MM 290); Poliis2 (Poliisopreno não identificado (NI)); epi-C (epi-Cubenol); Hidro (Hidrocarboneto C-26 NI).

Na análise por PCA, embora o grau de inflexão não tenha sido muito significativo no primeiro PC, é possível observar que 78,49% da variância dos dados é explicada nos dois primeiros PCs (Figura 4). Algumas amostras de natureza biológica, como as analisadas neste estudo, são uma matriz complexa e algumas características químicas naturalmente sofrem modificações, o que pode contribuir para a formação de aglomerados mistos. A Figura 5 mostra a distribuição das variáveis no gráfico de cargas e a Figura 6 mostra a distribuição das amostras no gráfico de pontuação, tanto para a combinação PC1 *versus* PC2. Esses gráficos são aplicados como uma forma de identificar e expressar a variância dos dados, destacando as semelhanças e diferenças entre as amostras.

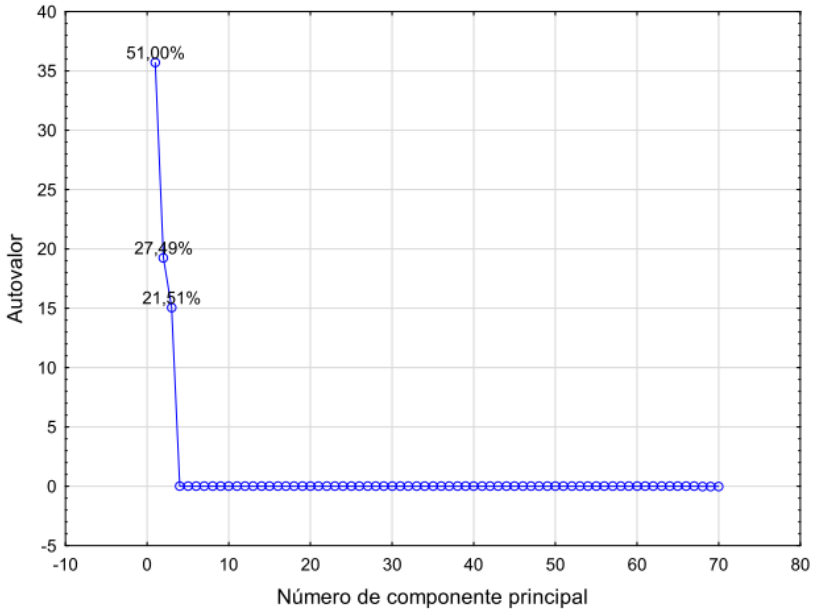


Figura 4. Screen-plot para os dados provenientes da análise elementar das amostras do óleo de lúpulo

De acordo com a Figura 6, observou-se que o tratamento com PCA permitiu agrupar amostras com características semelhantes, bem como identificar diferenças entre as amostras de óleo essencial de lúpulo cultivadas no Brasil e nos EUA. Na Fig. 14, as projeções de carregamento nos PCs permitem avaliar a contribuição de cada variável (constituintes do óleo) na separação dos grupos. A Tabela 3 mostra os valores associados às correlações entre as variáveis (constituintes do óleo) e os três componentes principais obtidos. Variáveis com valor de correlação acima de 0,6 foram consideradas como contribuição significativa.

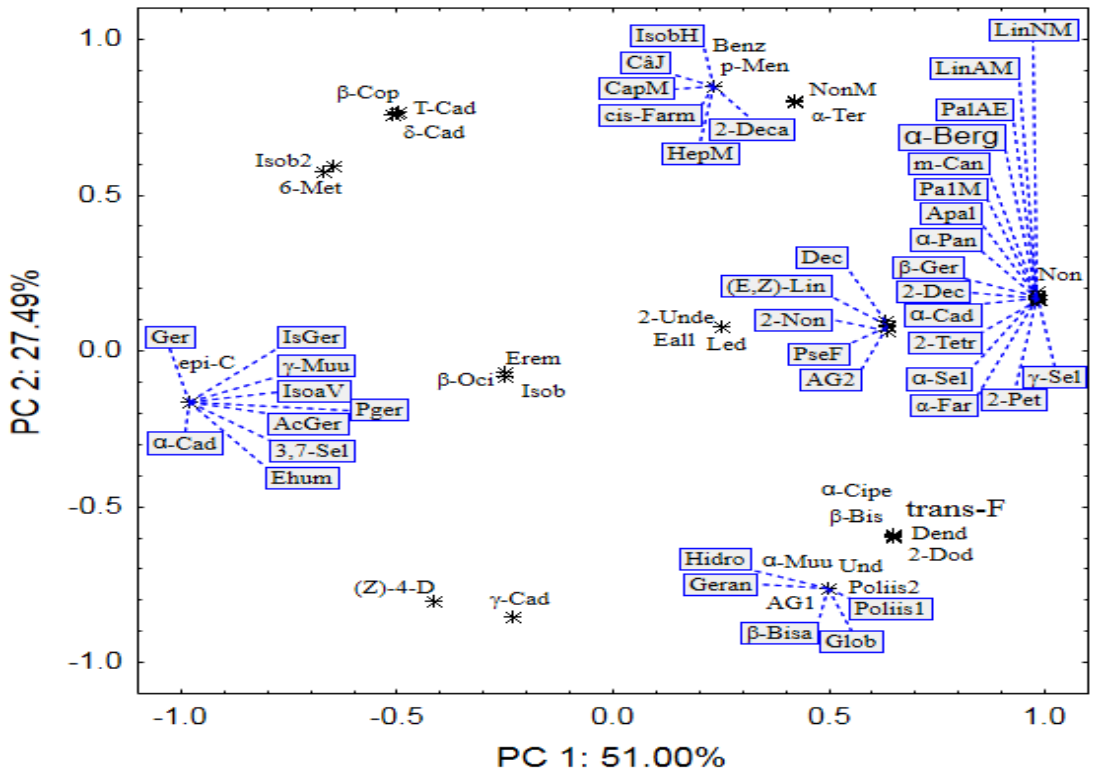


Figura 5. Gráfico dos loadings da PC1 versus PC2 para as amostras do óleo de lúpulo.

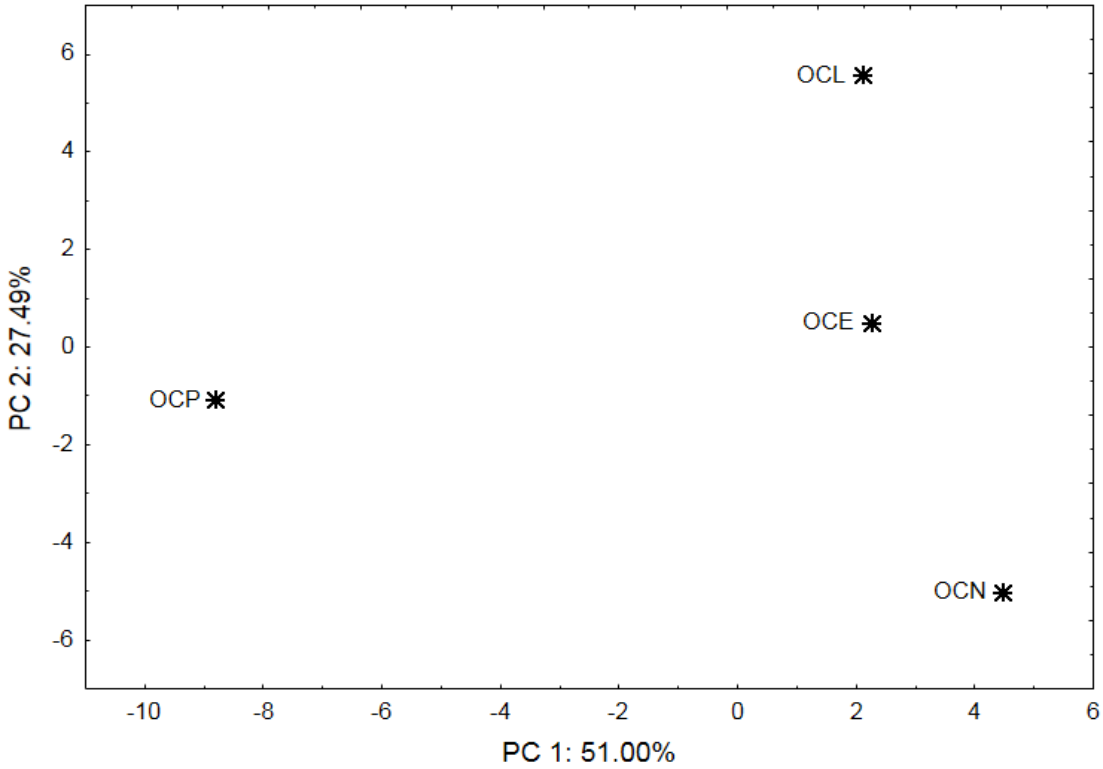


Figura 6. Gráfico dos escores da PC1 versus PC2 para as amostras do óleo de lúpulo

No gráfico dos escores (Figura 7), é possível observar a formação de três grupos de características: i) OCN; ii) OCE e OCL e iii) OCP. Os constituintes encontrados no óleo que mais contribuíram para a formação dos grupos foram os hidrocarbonetos sesquiterpênicos e os sesquiterpenos oxigenados.

Quanto às amostras, há certa semelhança entre OCN, OCE e OCL, quando avaliadas pelo eixo do componente maior (PC1). As três amostras são de origem brasileira e certamente os processos produtivos semelhantes no Brasil favoreceram a formação desse grupo no lado positivo do PC1. Por outro lado, a amostra de origem norte-americana (OCP) apareceu no lado negativo do PC1, demonstrando que o processo de produção nos EUA é bastante diferente do Brasil. Analisando apenas o eixo do segundo componente principal (PC2), as amostras OCE e OCP são mais facilmente agrupadas, demonstrando que o método de pré-tratamento da amostra interferiu parcialmente na composição química do óleo essencial extraído, tornando a amostra OCE semelhante ao lúpulo na forma de pellets (OCP). De uma forma geral, percebe-se que existe uma semelhança muito grande entre OCL e OCE ao mesmo tempo que existe uma diferença significativa na composição química entre OCN e OCP, considerando os dois PCs representados.

Portanto, o que possivelmente contribuiu para a diferença no OCP (cultivado nos EUA) foi o pré-tratamento aplicado antes da extração, influenciando na composição dos voláteis, principalmente no que diz respeito à composição dos hidrocarbonetos sesquiterpênicos do óleo (ϒ-Amorfeno, Muuroleno e δ-Cadineno). É sabido que existe uma diferença significativa no perfil da composição volátil do lúpulo cultivado no Brasil em relação ao cultivado nos EUA, e certamente está associada ao tipo de solo, clima, época de colheita, armazenamento e tratamento de água eliminação (Almaguer et al., 2014; Bocquet et al., 2018; Sharp, 2016). Devido a esta diferença considerável no perfil de voláteis apresentada, as análises subsequentes foram realizadas apenas com as amostras OCN e OCP, com o objetivo de verificar se essa diferença influenciava significativamente o potencial biológico do lúpulo.

3.3. Ensaio de atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi determinada aplicando dois métodos, DPPH e $ABTS^+$, juntamente com um método espectrofotométrico complementar de analise indireta da atividade antioxidante (redutores totais), esse método é baseado na interação de agentes redutores com o reagente de Folin-Ciocalteau. Sua composição engloba o ácido fosfotúngstico e ácido fosfomolíbdico, que são reduzidos a partir dos extratos ou substâncias

testadas, sendo um reagente não específico para grupos fenólicos, podendo sofrer interferências de outras substâncias redutoras presentes na amostra (Ikawa *et al*, 2003).

Os resultados encontrados de substâncias redutoras totais foram expressos em equivalentes de ácido gálicos (EAG) por grama da amostra do óleo essencial (OCN e OCP) (Tabela 3). Embora esse método seja comumente aplicado para a determinação de compostos fenólicos com potencial redutor, os resultados obtidos demostraram que embora não tenham sido identificados compostos fenólicos nas frações de óleo essencial, existem composto presentes que podem agir como redutores frente ao reagente de Folin-Ciocalteau. Os resultados de redutores totais encontrados de 102,86 mg EAG/g (OCN) e 96,11mg EAG/g (OCP) foram ainda superiores aos encontrados com um estudo realizado com extrato de lúpulo (29,16-36,62 mg EAG/g), onde há a presença de compostos fenólicos (Solarska & Sosnowska, 2015).

Tabela 3. Determinação da atividade antioxidante do óleo essencial de lúpulo

	Redutores Totais (mg EAG/g)	**ABTS (µMTrolox/g)**	**DPPH (AA%)**
OCN	102,86 ± 0,56	3252 ± 7,64	84,62 ± 0,27
OCP	96,11± 3,31	2807 ± 10,5	84,88 ± 0,48

A capacidade antioxidante das duas amostras foi realizada por métodos espectrofotométricos (ABTS e DPPH). Ambos baseiam-se na capacidade da amostra em capturar radicais livres, porém, diferem fortemente em estruturas químicas, afinidades e cinética de reação. No método ABTS, quando o antioxidante captura cátion $ABTS^{\bullet}+$ provoca um decréscimo na absorbância, que é lida a partir da mistura do radical com o antioxidante, sendo os seus resultados expressos em TEAC (Pérez-Jiménez & Saura-Calixto, 2006; Duarte-Almeida *et al*, 2006).

A atividade de eliminação do radical DPPH foi determinada como porcentagem de inibição que é equivalente ao poder de redução do óleo essencial de lúpulo, não sendo observadas diferenças significativas entre o potencial de inibição das amostras de óleo essencial. Já para a análise baseada no poder de inibição do ABTS expressos em µMTrolox/mL de óleo essencial houve uma diferença entre as amostras, onde a OCN apresentou potencial de inibição um pouco maior em relação a OCP (Tabela 3). Embora tenha sido observada uma diferença na composição química do óleo essencial extraído do lúpulo

cultivado no Brasil (OCN) em relação ao cultivado no EUA (OCP), o mesmo não influenciou significativamente a capacidade antioxidante desses óleos.

Em comparação com os polifenóis encontrados no lúpulo, as propriedades antioxidantes dos óleos essenciais são muito mais complexas, uma vez que as propriedades antioxidantes dos compostos terpênicos (compostos majoritários no óleo essencial de lúpulo) podem variar, sendo assim um mesmo composto pode se comportar de forma neutra, exibir forte potencial antioxidante ou, em muitos casos, também pode atuar como pró-oxidante, como é o caso do linalol, β-pineno (encontrado no OCN e OCP) e trans-farnesol (apenas OCN e OCE) (Karabín *et al*., 2016; de Lima Guimarães *et al*., 2014)

Estudos também mostraram o poder antioxidante do monoterpeno β-mirceno (capaz de prevenir o dano oxidativo das células de rato), e dos sesquiterpênicos, α-humuleno e β-cariofileno (capaz de eliminar radicais e prevenir a oxidação lipídica), além do sesquiterpeno β-farneseno (capaz reduzir o oxidante induzido por estresse H_2O_2, sugerindo a possibilidade de seu uso para a prevenção de certas doenças neurodegenerativas), sendo esses terpenos encontrados tanto na amostra de óleo OCN quanto OCP (Bonamin *et al*., 2014; Chen *et al*., 2014; de Lima Guimarães *et al*., 2014; Calleja *et al*., 2012; Turkez *et al*., 2014).

3.4. Ensaio de atividade antibacteriana

Os resultados dos ensaios de atividade antibacteriana dos produtos OCP e OCN versus cepas de espécies bacterianas estão descritos na Tabela 4. De acordo com os resultados as amostras de óleo essencial (OCN e OCP) inibiram o crescimento das espécies bacterianas, em concentrações que apresentaram uma variação de CIM de 64 a 256 µg/mL. Os produtos OCP e OCN, nas concentrações de 64 a 256 µg/mL, inibiram o crescimento de 50% das bactérias incluindo *S. aureus* ATCC-25923, *S. aureus* LM-314, *P. aeruginosa* ATCC-25853 e *P. aeruginosa* ATCC-9027. O resultado da atividade inibitória mais significativa foi do produto OCP cuja CIM foi de 64 µg/mL para o gênero *Staphylococcus* em relação ao OCN, que para o mesmo gênero foi de 128 µg/mL (*S. aureus M*-314) e 256 µg/mL (*S. aureus* ATCC-25923).

Tabela 4. Avaliação da CIM (1024 a 4 µg/mL) de óleo essencial de lúpulo sobre bactérias

	Micro-organismos/CIM (µg/mL)							
Produtos (µg/ mL)	*S. aureus* ATCC-25923	*S. aureus M*-314	*P.aeruginosa* ATCC-25853	*P.aeruginosa* ATCC-9027	*E,. coli* ATCC-18739	*E. coli* LM-362	*S. epidermidis* ATCC-12228	*B. subtilis* ATCC-6633

OCP	64	64	256	256	+	+	+	+
OCN	256	128	256	256	+	+	+	+
Meio de cultura	-	-	-	-	-	-	-	-
Micro-orgaismo	+	+	+	+	+	+	+	+
Clorofenicol	256	256	512	512	1024	1024	256	512
Nistatina	NA	NA	NA-	NA-	NA-	NA-	NA-	NA

(+) Crescimento microbiano (-) Ausência de crescimento microbiano (NA): Não aplicado

Essa diferença no potencial inibitório do crescimento para essas bactérias (*S. aureus* ATCC-25923 e *S. aureus M*-314) pode estar relacionada à presença e/ou níveis de alguns terpenos identificados nas duas frações do óleo essencial.

O monoterpeno β-mirceno, por exemplo, já foi relatado em estudos microbiológicos como agente antibacteriano frente à *Staphylococcus aureus* (encontrada na pele e nas fossas nasais, podendo provocar infeção leves e graves), *Escherichia coli* (podendo causar infecções do trato digestivo e trato urinário), *Salmonella entérica* (relacionada com patologias de origem alimentar) (Wang, *et al*., 2019). Esse monoterpeno foi encontrado nas duas amostras de óleo essencial, OCN (20,9%) e OCP (37,1%). Além disso, o β-humuleno e α-cariofileno, dois terpenos principais encontrados o óleo essencial do lúpulo e também encontrados nas amostras de óleo OCN (β-humuleno-0,10%; α-cariofileno-2,66%) e OCP (β-humuleno-14,4%; α-cariofileno-9,85%) mostraram efeitos antibacteriano moderados contra as bactérias *P. vulgaris, E. faecalis, E. coli, P. aeruginosa, Salmonella sp*.. (Karabín *et al*., 2016; Jirovetz *et al*., 2006; Yousefzadi *et al*., 2008).

Dois dos álcoois encontrados nas amostras de óleo de lúpulo, também apresentam propriedades antibacterianas, como, o linalol encontrado nas duas amostras e o geraniol, encontrado apenas no OCP. As propriedades antimicrobianas do linalol foram confirmadas (MIC = 0,3 - 1,9 mg/mL) por meio de testes contra as espécies bacterianas *S. aureus, E. coli, B. subtilis, Pasteurella multocida* e mostrou excelente atividade antibacteriana contra bactérias que causam problemas dentários (Park *et al*., 2012; Hussain *et al*., 2008).

Outro terpeno, como o α-Muuroleno encontrados apenas na amostra de óleo OCN e o β-pineno, identificados nas duas amostras de óleo (OCN e OCP) já tiveram o seu potencial antimicrobiano comprovado em alguns estudos (Edrada *et al*., 2000; Perez - Lopez *et al*., 2011).

Apesar de algumas diferenças na composição química a atividade antibacteriana dos O.Es. do lúpulo Columbus foram interpretados e considerados como forte/ótima atividade (50-500 μg/mL) (Holetz et al., 2002; Houghton et al., 2007). Demostrando o grande potencial biológico do óleo essencial extraído do lúpulo cultivado no Brasil, sendo este promissor para futuros testes, uma vez que apresentou uma composição química rica em compostos com potencial antibacteriano, podendo ser usando em um espectro muito amplo, como por exemplo, tecnologia de alimentos, cosméticos e medicamentos, tendo como algumas das finalidades o controle de infecções bacterianas.

3.5. Ensaio da avaliação citotoxicidade

As plantas são conhecidas popularmente por possuírem muitos usos terapêuticos, no entanto algumas em determinadas concentrações apresentam toxidade ao ser humano, é devido a isso que ensaios citotóxicos são importantes para prevenir intoxicações. Nesse estudo do óleo essencial de genótipos de lúpulo foi realizado um ensaio *in vitro* de citotoxicidade com células sanguíneas (eritrócitos humanos) apresentados na Figura 16, avaliando assim se existem possíveis efeitos danosos do produto oriundo do material vegetal à membrana celular dos eritrócitos (Rodrigues *et al*., 2010; Martins *et al*., 2012).

O lúpulo vem sendo usado durante muitos anos na produção de cerveja e na medicina popular e nenhum caso grave de toxicidade foi relatado, no entanto a toxicidade e os efeitos toxicológicos do lúpulo devem ser sempre considerados, tanto no que diz respeito a sua forma de aplicação, quanto às concentrações de compostos presentes no lúpulo de forma individual. Até hoje os estudos realizados para avaliar possíveis toxicidades dos compostos químicos do lúpulo in vitro e in vivo, são em sua maioria de resultados negativos (Karabín *et al*., 2016).

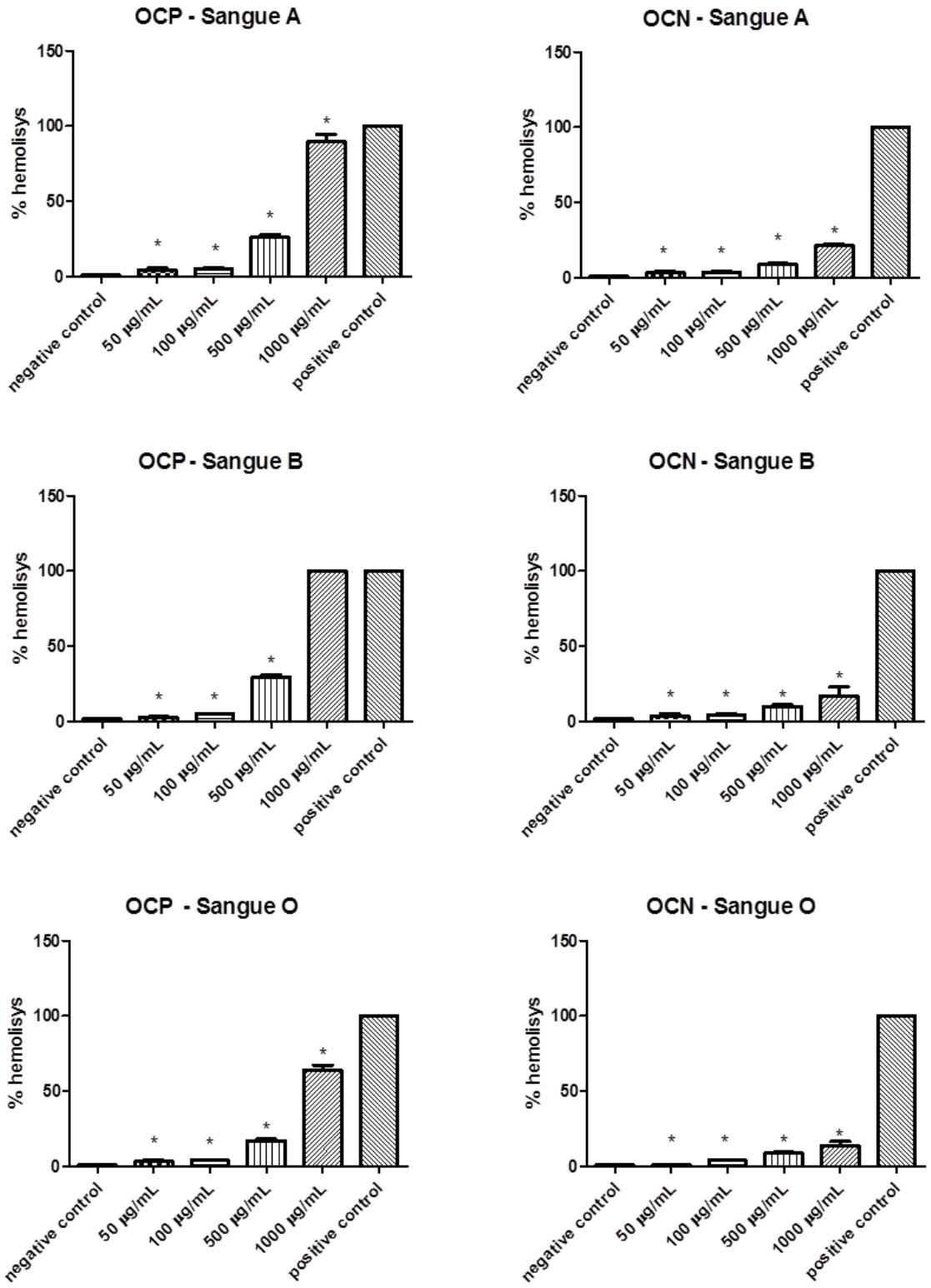


Figura 7. Avaliação da citotoxicidade do óleo de lúpulo em eritrócitos humanos.
Eritrócitos tipo A, B, O; Controle negativo (eritrócitos 0.5%), Controle Positivo (1% Triton X-100). $P < 0.05$ (*), versus controle positivo.

O resultado da atividade hemolítica das amostras de óleo essencial de lúpulo (OCN e OCP) é mostrado na Figura 8. Cada concentração mostra a média de porcentagem de

hemólise repetida em três experimentos. De acordo com Rangel *et al*., (1997) o percentual de hemólise entre 0 a 40% pode ser considerado baixo, de 40 a 80% moderado e acima de 80% alto. Mesmo testando em diferentes tipos sanguíneos a amostra OCN até na maior concentração, não atingiu 40% de hemólise, sendo considerada de baixa citotoxicidade. Já a amostra OCP apresentou percentual de hemólise acima de 50% para todos os tipos de eritrócitos testados quando aplicada maior concentração (1000 µg/mL), podendo estar associado à toxicidade aguda e de longo prazo de terpenos presentes em maior concentração nessa amostra de óleo essencial (Adams *et al*., 2011; Llana - Ruiz - Cabello *et al*., 2015).

A toxicidade dos principais compostos terpênicos do lúpulo é normalmente muito baixa ou nenhuma, como já foi relatado com um estudo in vitro para o mirceno, cariofileno, geraniol e linalol, ambos encontrados em maior concentração na fração de óleo extraído dos pellets de lúpulo cultivado no EUA (OCP) (Adams *et al*., 2011; Gomes-Carneiro *et al*., 2005; Di Sotto *et al*., 2010; Sinha *et al*., 2014; Mitic-Culafic *et al*., 2009).

No entanto, como observado na analise da atividade antimicrobiana é necessário doses abaixo de 300 µg/mL para inibir o crescimento de algumas bactérias. Assim, as amostras em concentrações menores são consideradas de baixa citotoxicidade. Essa característica torna esse produto um promissor candidato como fitomedicamento antimicrobiano ou fitocomplexo, tanto a OCN quanto a OCP também apresentaram um bom potencial antioxidante.

Considerações Finais

Nesse estudo os resultados das análises foram baseados em dois momentos, traçar o perfil químico dos voláteis e sua possível influencia no potencial biológico dos óleos essenciais de Lúpulo (*Humulus lupulus L.)* em flor (cultivado no Brasil) e em pellets (cultivado do EUA) da variedade Columbus.

O método de hidrodestilação foi eficiente para a extração de óleo essencial, possibilitando as análises de cromatografia gasosa (CG-EM e CG-DIC) sendo identificado mais de 80 compostos no total de quatro amostras (OCN, OCE, OCL e OCP), possibilitando traçar um perfil químico dos óleos essenciais, além de evidenciar perdas e possíveis degradações de alguns compostos voláteis durante o pré-tratamento do material vegetal, influencia diretamente não só no rendimento do óleo extraído, mas também na composição dos voláteis.

As similaridades e diferenças no perfil volátil dos óleos foram facilmente visualizadas com a aplicação do ACP, mostrando a influencia dos terpenos na diferenciação de cultivares

de mesma variedade, o que já era esperado, uma vez que a planta foi cultivada em país diferente, passando por período de colheita, cultivo, processo de secagem e armazenamento diferentes. Ainda assim, foi possível identificar os compostos principais em ambas às amostras (β-mirceno, α-humuleno, β-cariofileno e β-farneseno).

O potencial biológico foi avaliado através da análise da atividade antioxidante, antimicrobiana e ensaio citotóxico (atividade hemolítica). Apesar de algumas diferenças na composição química as atividades antioxidante e antimicrobiana dos O.Es. do lúpulo Columbus foram consideradas como ótimos, apresentando potencial de inibição de radiais livres e contra bactérias Gram-positivas (*S. aureus* ATCC-25923, *S. aureus* M-314, *P.aeruginosa* ATCC-25853).

Por fim, com o ensaio citotóxico foi possível reafirmar o promissor potencial biológico do lúpulo. Apresentando apenas para o óleo extraído dos pellets do lúpulo cultivado no EUA um percentual de hemólise acima de 50% em altaconcentração (1000 µg/mL), enquanto que o óleo extraído dos cones do lúpulo cultivado no Brasil testado em diferentes tipos sanguíneos até na maior concentração, não atingiu 40% de hemólise, sendo considerada de mais baixa citotoxicidade. Evidenciando o grande potencial biológico do óleo essencial extraído do lúpulo cultivado no Brasil, apresentando uma diversidade muito grande de substâncias em sua composição, possuindo grandes contribuições bioativas para formulação de medicamentos, cosméticos e aditivos em alimentos, necessitando assim de maiores estudos.

Agradecimentos

Os autores agradecem às agências de fomento FAPESB pelo suporte financeiro para as pesquisas realizadas e a CAPES pela bolsa de mestrado concedida.

Referências Bibliográficas

Aberl, A., & Coelhan, M. (2012). Determination of Volatile Compounds in Different Hop Varieties by Headspace-Trap GC/MS—In Comparison with Conventional Hop Essential Oil Analysis.*J. Agric. Food Chem*. 2012, 60, 2785−2792. https://doi.org/10.1021/jf205002p

Adams, R.P. (2007) Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4ª. ed., Illinois: Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 2007.

Adams, T.B., Gavin, C.L., McGowen, M.M., Waddell, W.J., Cohen, S.M., Feron, V.J., Marnett, L.J., Munro, I.C., Portoghese, P.S., Rietjens, I.M.C.M., Smith, R.L. (2011). The

FEMA GRAS assessment of aliphatic and aromatic terpene hydrocarbons used as flavor ingredients. *Food Chem Toxicol* 49(10):2471–94. https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.06.011

Almaguer, C., Schonberger, C., Gastl, M., Arendt, E. K., Becker, T (2014). *Humulus lupulus* – a story that begs to be told. *A review Inst. Brew*, *120*, 289. https://doi.org/10.1002/jib.160

Antunes, R. M. P., Lima, E. O., Pereira, M. S. V., Camara, C. A., Arruda, T. A., Catão, R. M. R., Barbosa, T. P., Nunes, X. P., Dias, C. S., Silva, T. M. S. (2006). Atividade antimicrobiana "in vitro" e determinação da concentração inibitória mínina (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.16, n. 4, p. 517-524. http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2007000400016

Araújo Couto, H. G. S. d., Blank, A. F., de Oliveira e Silva, A. M., de Lima Nogueira, P. C., de Fátima Arrigoni-Blank, M., de Castro Nizio, D. A., & de Oliveira Pinto, J. A. (2019). Essential oils of basil chemotypes: major compounds, binary mixtures, and antioxidant activity. *Food Chemistry*. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.04.078

Ascrizzi, R., Iannone, M., Cinque, G., Marianelli, A., Pistelli, L., & Flamini, G. (2020). "Hemping" the Drinks: Aromatizing Alcoholic Beverages with A Blend of *Cannabis sativa* L. Flowers. *Food Chemistry*, *126909*. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126909

Bezerra, A. S. (2012). Avaliação de compostos funcionais de grãos e extrato concentrado de cevada visando aplicações nutricionais. 2012.108 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologiados Alimentos) – Centro de Ciências Rurais, *Universidade Federal de Santa Maria*, Santa Maria.

Biendl, M., Engelhard, B., Forster, A., Gahr, A., Lutz, A. Mitter, W., Schmidt, R., Schönberger, C. (2014).Hops – Their Cultivation, Composition and Usage, Fachverlag Hans Carl, 2014.

Bocquet, L., Sahpaz, S., Hilbert, J. L., Rambaud, C., & Rivière, C. (2018). *Humulus lupulus L.*, a very popular beer ingredient and medicinal plant: overview of its phytochemistry, its bioactivity, and its biotechnology. *Phytochemistry Reviews*. https://doi.org/10.1007/s11101-018-9584-y

Bonamin, F., Moraes, T.M., dos Santos, R.C., Kushima, H., Faria, F.M., Silva, M.A., Junior, I.V., Nogueira, L., Bauab, T.M., Brito, A.R.M.S., da Rocha, L.R.M., Hiruma-Lima, C.A. (2014). The effect of a minor constituent of essential oil from Citrus aurantium: The role of β-myrcene in preventing peptic ulcer disease. *Chemico-Biological Interactions*, 212, 11–19. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.01.009

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel – Wissenschaft und -Technologie, v. 22, p. 25-30.

Brereton, R. G. (2003). Chemometrics: Data analysis for the laboratory and chemical plant. John Wiley & Sons

Britto, R.S. (2014). Detecção de falhas com PCA e PLS aplicados a uma planta didática. Dissertação de Mestrado-*Universidade Federal de Sergipe* –UFS. São Cristovão.

Bruneton, J. (2016) Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes me´dicinales, 5th edn. *Lavoisier*, Tec & Doc, Paris.

Burdock, G. A. (2010). Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients (Sixth). Boca Raton (FL), U.S.A.: CRC Press.

Calleja, M. A., Vieites, J. M., Montero-Meterdez, T., Torres, M. I., Faus, M. J., Gil, A., & Suárez, A. (2012). The antioxidant effect of β-caryophyllene protects rat liver from carbon tetrachloride-induced fibrosis by inhibiting hepatic stellate cell activation. *British Journal of Nutrition*, 109(03), 394–401. https://doi.org/10.1017/s0007114512001298

Camargo, S. B. & Vasconcelos, D. F. S. A. de. (2014). Atividades biológicas de linalol: conceitos atuais e possibilidades futuras deste monoterpeno. *Rev. Ciênc. Méd. Biol*., Salvador, v. 13, n. 3 – especial, p. 381-387, set./dez. http://repositorio.ufba.br/ri/handle/ri/23193

Caredda, A., Marongiu, B., Porcedda, S., Soro, C.(2002). Supercritical carbon dioxide extraction and characterization of Laurus nobilis essential oil, *J. Agric. Food Chem*., 50, 6, 1492-1496. https://doi.org/10.1021/jf0108563

Chen, Q.Q., Gan, Z.L., Zhao, J.H., Wang, Y., Zhang, S.M., Li, J.M., Ni, Y.Y. (2014). In vitro comparison of antioxidant capacity of cumin (Cuminum cyminum L.) oils and their main components.LWT-*Food Sci Technol* 55(2):632–7. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.09.017

Cleland, R. & Squires, E. (1991). Evaluation of new antimicrobials "*in vitro*" and in experimental animal infections. In: LORIAN, V. M. D. Antibiotics in Laboratory Medicine. Williams & Wilkins, p. 739-788.

Di Sotto, A., Mazzanti, G., Carbone, F., Hrelia, P., Maffei, F. (2010). Inhibition by beta-caryophyllene of ethyl methanesulfonate-induced clastogenicity in cultured human lymphocytes. *Mutat Res-Gen Tox En* 699(1–2):23–8. https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2010.04.008

Duarte, A., Luís, Â., Oleastro, M., & Domingues, F. C. (2016). Antioxidant properties of coriander essential oil and linalool and their potential to control Campylobacter spp. *Food Control*, 61, 115–122. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.09.033

Duarte-Almeida, J. M., Santos, R. J. dos, Genovese, M. I., Lajolo, F. M. (2006). Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β-caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. *Ciênc. Tecnol. Aliment*., Campinas, v. 26, n. 2. p. 446-52. https://doi.org/10.1590/S0101-20612006000200031

Durello, R. S., Silva, L. M., Bogusz jr, S. (2019). Química do lúpulo. *Quim. Nova*, Vol. 42, No. 8, 900-919. Epub Oct 21, 2019. ISSN 1678-7064. https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170412

Figiel, A., Szumny, A., Gutierrez-Ortiz, A., Carbonell-Barrachina, A. A. (2010).Composition of oregano essential oil (*Origanum vulgare*) as affected by drying method. *Journal of Food Engineering*, 98:240-247. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.01.002

Filip, S., Vidović, S., Vladić, J., Pavlić, B., Adamović, D., & Zeković, Z. (2016). Chemical composition and antioxidant properties of Ocimum basilicum L. extracts obtained by supercritical carbon dioxide extraction: Drug exhausting method. The *Journal of Supercritical Fluids*, 109, 20–25. https://doi.org/10.1016/j.supflu.2015.11.006

Freire, I.C.M., Pérez, A.L.A.L., Cardoso, A.M.R., Mariz, B.A.L.A., Almeida, L.F.D., Cavalcanti, Y.W., Padilha, W.W.N. (2014). Atividade antibacteriana de Óleos Essenciais

sobre *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus.* *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v.16 n.2. https://doi.org/10.1590/1983-084X/12_053

Gomes-Carneiro, M.R., Viana, M.E.S., Felzenszwalb, I., Pauragartten, F.J.R. (2005). Evaluation of beta-myrcene, alpha-terpinene and (+)- and (-)-alphapinene in the Salmonella/microsome assay. *Food Chem Toxicol*43(2):247–52. https://doi.org/10.1016/j.fct.2004.09.011

Gonçalves, J. L., J. A. Figueira, F. P. Rodrigues, L. P. Ornelas, R. Branco, C. L. Silva, and J. S. Camara. (2014). A powerful methodological approach combining headspace solid phase microextraction, mass spectrometry and multivariate analysis for profiling the volatile metabolomic pattern of beer starting raw materials. *Food Chemistry* 160:266–280. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.065

Gonçalves, J., Figueira, J., Rodrigues, F., & Câmara, J. S. (2012). Headspace solid-phase microextraction combined with mass spectrometry as a powerful analytical tool for profiling the terpenoid metabolomic pattern of hop-essential oil derived from Saaz variety. *Journal of Separation Science, 35(17), 2282–2296.* https://doi.org/10.1002/jssc.201200244

Gros, J., Nizet, S., & Collin, S. (2011). Occurrence of Odorant Polyfunctional Thiols in the Super Alpha Tomahawk Hop Cultivar.Comparison with the Thiol-rich Nelson Sauvin Bitter Variety.*J. Agric. Food Chem*. 2011, 59, 8853–8865. https://doi.org/10.1021/jf201294e

Guimaraes, L.G.L., Cardoso, M.G., Andrade, J., Teixeira, M.L., de Souza Gomes, M., Machado, S.M.F. (2014). Antioxidant capacity of essential oils extracted from Lippia sidoides, Ageratum fastigiatum, Ocotea odorifera, Mikania glauca and their major components. J Med Plants Res 8(16):632–9. https://doi.org/10.5897/JMPR2014.5369

Hadacek, F. & Greger, H. (2000). Testing of antifungal natural products: methodologies, comparatibility of results and assay choice. *Phytochemical Analyses*, v. 11, p. 137-147. https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1565(200005/06)11:3<137::AID-PCA514>3.0.CO;2-I

Hafidh, R. R., Abdulamir, A. S., Vern, L. S., Bakar, F. A., Abas, F., Jahanshiri, F.And Sekawi, Z. (2011).Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by a natural product.*The Open Microbiology Journal*, v. 5, p. 98-106. https://doi.org/10.2174/1874285801105010096

Holetz, F.B., Homes, M. J., Lee, C. C., Steventon, G. (2002). Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, n. 7, p. 1027-1031. https://doi.org/10.1590/S0074-02762002000700017

Hops: Their Cultivation, Composition and Usage; Fachverlag Hans Carl: Nuremberg, Germany, 2014.

Hopsteiner, Hop Varieties, S.S. Steiner, Inc., New York 2011.

Hopunion, L., Hop Variety Handbook, Hopunion LLC, Yakima, Washington, DC 2011.

Houghton, P. J., Howes, M. J., Lee, C. C., Steventon, G. (2007). Uses and abuses of *in vitro* tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. *Journal of Etnopharmacology*, v.110, p.391-400. https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.01.032

Hussain, A.I., Anwar, F., Sherazi, S.T.H, Przybylski, R. (2008). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depend on seasonal variations. *Food Chem.* 108: 986-995. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.010

Ikawa, M., Schaper, T.D., Dollard, C.A., Sasner, J.J. (2003). Utilization of Folin-Ciocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds. *J. Agric. F. Chem.* 51, 1811-1815. https://doi.org/10.1021/jf021099r

Jeliazkova, E., Zheljazkov, V.D., Kačániova, M., Astatkie, T., Tekwani, B.L. (2018). Sequential Elution of Essential Oil Constituents during Steam Distillation of Hops (Humulus lupulus L.) and Influence on Oil Yield and Antimicrobial Activity. *Journal of Oleo Science*, v. 67, n. 7, p. 871–883. https://doi.org/10.5650/jos.ess17216

Jirovetz, L., Buchbauer, G., Stoilova, I., Stoyanova, A., Krastanov, A. (2006). Schmidt, E. Chemical composition and antioxidant properties of clove leaf essential oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v.54, n. 17, p. 6303-6307, Aug. https://doi.org/10.1021/jf060608c

Jolliffe, I.T. & Cadima, J. (2016). Principal component analysis: a review and recent developments, Phil. *Trans. R. Soc.* A 374, 1–15. https://doi.org/10.1098/rsta.2015.0202

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

Katiki, L. M., Barbieri, A. M. E., Araujo, R. C., Veríssimo, C. J., Louvandini, H., & Ferreira, J. F. S. (2017). Synergistic interaction of ten essential oils against Haemonchus contortus in vitro.*Veterinary Parasitology*, 243(June), 47–51. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.06.008

Kim, D. O., Lee, K. W., Lee, H. J., Lee, C. Y. (2002). Vitamina C equivalente antioxidant capacity (VCEAC) of phenolics phytochemicals.*Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, p. 3713-3717. https://doi.org/10.1021/jf020071c

Koetter, U. & Biendl, M. (2010). Humulus lupulus.A Review of its Historic and Medicinal Uses. *HerbalGram*, Issue: 87 Page: 44-57.

Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., García-Parilla, M. C.; Troncoso, A. M., Fett, R. (2004). Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 24, n. 4, p. 691-693. https://doi.org/10.1590/S0101-20612004000400036

Leonardi, M., Skomra, U., Agacka, M., Stochmal, A., Ambryszewska, K. E., Oleszek, W., Flamini, G., Pistelli, L. (2013). Characterisation of four popular Polish hop cultivars. *International Journal of Food Science & Technology*, 48(8), 1770–1774. https://doi.org/10.1111/ijfs.12150

Li, W., Peng, M., & Wang, Q. (2018). Improved PCA method for sensor fault detection and isolation in a nuclear power plant. *Nuclear Engineering and Technology*. 51,146. https://doi.org/10.1016/j.net.2018.08.020

Llana-Ruiz-Cabello, M., Pichardo, S., Maisanaba, S., Puerto, M., Prieto, A.I., Gutierrez-Praena, D., Jos, A., Camean, A.M. (2015).In vitro toxicological evaluation of essential oils and their main compounds used in active food packaging: a review. *Food Chem Toxicol* 81:9–27. https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.03.030

Martins, R. T., Almeida, D. B. D., Monteiro, F. M. D. R., Kowacs, P. A., Ramina, R. (2012). Receptores opioides até o contexto atual. *Revista Dor*, 13(1), 75-79.

Matsui, H., Inui, T., Ishimaru, M., Hida, Y., and Oka, K. (2013). In The influence of the age of a hop plant on the quality of hop aromas in beer.Acta Hortic. 1010:171-182. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2013.1010.20

Mitic-Culafic, D., Zegura, B., Nikolic, B., Vukovic-Gacic, B., Knezevi-Vukcevic, J., Filipic, M. (2009). Protective effect of linalool, myrcene and eucalyptol against t-butyl hydroperoxide induced genotoxicity in bacteria and cultured human cells. *Food Chem Toxicol* 47(1):260–6. https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.11.015

Nascimento, P. F. C., Nascimento, A. C., Rodrigues, C. S., Antoniolli, A. R., Santos, M. P. O., Júnior, A. M. B., Trindade, R. C. (2007). Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 17, n. 1, p. 108-113. http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2007000100020

NATIONAL COMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS- NCCLS. (2002). Performance Standards for Antimicrobial Suceptibility testing; Twelth informational suplement M100-512, vol. 22, nº 01.

Olsovska, J., Bostikova, V., Dusek, M., Jandovska, V., Bogdanova, K., Cermak, P., Bostik, P., Mikyska, A., Kolar, M. (2016) *Humulus lupulus L.* (hops) – a valuable source of compounds with bioactive effects for future therapies. Mil. Med. Sci. Lett. (Voj. Zdrav. Listy) 85, 19-30. https://doi.org/10.31482/mmsl.2016.004

Park, S.-N., Lim, Y. K., Freire, M. O., Cho, E., Jin, D., Kook, J.-K. (2012). Antimicrobial effect of linalool and alpha-terpineol against periodontopathic and cariogenic bacteria. Anaerobe 18(3):369–72. https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.04.001

Pereira, F. O., Mendes, J. M., Lima, I. O., Mota, K. S. L., Oliveira, W. A., Lima, E. O. (2014). Antifungal activity of geraniol and citronellol, two monoterpenes alcohols, against Trichophyton rubrum involves inhibition of ergosterol biosynthesis. *Pharmaceutical Biology*, v. 53, n. 2, p. 1–7. https://doi.org/10.3109/13880209.2014.913299

Pérez-Jiménez, J. & Saura-Calixto, F. (2006). Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. *Food Res Int*, 39:791-800. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.02.003

Praet, T., Van Opstaele, F., Steenackers, B., De Brabanter, J., De Vos, D., Aerts, G., & De Cooman, L. (2015). Changes in the hop-derived volatile profile upon lab scale boiling. *Food Research International*, 75, 1–10. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.05.022

Rangel, M., Malpezzi, E. L. A., Susini, S. M. M., Freitas, J. C. Hemolytic activity in extracts of the diatom Nitzsnhia. *Toxicon*, v.35, 305-309, 1997. https://doi.org/10.1016/s0041-0101(96)00148-1

RE, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999).Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay.*Free Radical Biology and Medicine*, v. 26, p. 1231-1237. https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3

Rice-Evans, C.; Miller, N. J.; Papanga, G. (1996).Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolics acids.Free Radical Biology and Medicine, v. 20, p. 933-956. https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02227-9

Rodrigues, E., Duarte-Almeida, J. M., & Pires, J. M. (2010). Perfil farmacológico e fitoquímico de plantas indicadas pelos caboclos do Parque Nacional do Jaú (AM) como potenciais analgésicas: parte I. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20(6), 981-991. https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010005000008

Ruberto, G. & Baratta, M.T. (2000). Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chemistry*, v. 69, n. 02, p. 167-174. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00247-2

Salanţă, L.-C., Tofană, M., Socaci, S., Mudura, E., Pop, C., Pop, A., & Fărcaş, A. (2015). Determination of Volatiles in Hops from Romania by Solid Phase Fiber Microextraction and Gas Chromatography–Mass Spectrometry.*Analytical Letters, 49(4), 477–487*. https://doi.org/10.1080/00032719.2015.1075129

Sartoratto, A., Machado, A. L. M., Delarmelina, C., Figueira, G. M., Duarte, M. C. T., Rehder, V. L. G. (2004). Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 35, p. 275-280. http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822004000300001

Sharp, D. (2016) Factors that influence the Aroma and Monoterpene Alcohol Profile of Hopped Beer. Dissertation, *Oregon State University*.

Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965).Colorimetry of total phenolics with phosphomolybidic-phosphotungstic acid reagent. *American Journal of Enology and Viticulture*, v.16, p.144-158.

Sinha, S., Jothiramajayam, M., Ghosh, M., Mukherjee, A. (2014).Evaluation of toxicity of essential oils palmarosa, citronella, lemongrass and vetiver in human lymphocytes.*Food Chem Toxicol* 68:71–7. https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.02.036

Solarska, E., Sosnowska, B. (2015). The impact of plant protection and fertilization on content of bioactive substances in organic hops. *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus*, 14(3), 93-101

Turkez, H., Sozio, P., Geyikoglu, F., Tatar, A., Hacimuftuoglu, A., Di Stefano, A. (2014). Neuroprotective effects of farnesene against hydrogen peroxide-induced neurotoxicity in vitro. *Cell Mol Neurobiol* 34(1):101–11. https://doi.org/10.1007/s10571-013-9991-y

Tyśkiewicz, K., Gieysztor, R., Konkol, M., Szałas, J., & Rój, E. (2018). Essential Oils from Humulus Lupulus scCO2 Extract by Hydrodistillation and Microwave-Assisted Hydrodistillation. *Molecules*, 23(11), 2866. https://doi.org/10.3390/molecules23112866

Van Cleemput, M., Cattoor, K., De Bosscher, K., Haegeman, G., De Keukeleire, D., Heyerick, A. (2009). Hop (*Humulus lupulus*) derived bitter acids as multipotentbioactive compounds. *J. Nat. Prod*, 72, 1220–1230. https://doi.org/10.1021/np800740m

Wang, C.-Y., Chen, Y.-W., & Hou, C.-Y.(2019). Antioxidant and antibacterial activity of seven predominant terpenoids. *International Journal of Food Properties, 22(1), 229–237*. https://doi.org/10.1080/10942912.2019.1582541

Yan, D., Wong, Y. F., Shellie, R. A., Marriott, P. J., Whittock, S. P., & Koutoulis, A. (2019). Assessment of the phytochemical profiles of novel hop *(Humulus lupulus L.)*

cultivars: A potential route to beer crafting. *Food Chemistry*, 275, 15–23. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.082

Zawadzki, A., Alloo, C., Grossi, A. B.,do Nascimento, E. S. P., Almeida, L .C., Bogusz Junior, S., Skibsted, L. H., Cardoso, D. R. (2018) Effect of hop β-acids as dietary supplement for broiler chickens on meat composition and redox stability. *Food Research International*, v. 105, p. 210-220, 2018. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.072

Zhang, Y., Liu, X., Wang, Y., Jiang, P., & Quek, S. (2016). Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus. Food Control*, 59, 282–289. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.05.032

Capítulo 3. Resina do *Humulus lupulus* var. Columbus cultivado no Brasil: Análise da composição química, atividade antioxidante, antibacteriana e de Citotoxicidade.

Resumo: O Lúpulo (*H umulus lupulus* L.) é matéria prima utilizada em larga escala na produção de cerveja, uma vez que o mesmo atribui à bebida características organolépticas de aroma e amagor. A resina é a fração responsável pelo amargor, correspondendo por cerca de 15 a 30% do peso total dos cones de lúpulo seco e é constituída por uma misturas de compostos análogos (humulonas e lupulonas) que pode variar sua composição química e potencial biológico de acordo com sua origem, modo de cultivo, região, clima, solo além do período da colheita. O objetivo desse estudo foi identificar e quantificar os α-β-ácidos da resina de lúpulo da variedade Columbus, extraído dos cones de flores in natura cultivado no Brasil e em pellets oriundo dos EUA. Neste estudo se confirmou que há diferença na concentração percentual de compostos identificados nas amostras de resina, influenciando nos potenciais biológicos Os resultados indicaram que as resinas de lúpulo cultivado no Brasil apresentaram aceitáveis índices de compostos α-ácidos amargos (10-45% de cohumulona, 19-37% de N+adhumulona, 36-39% de Colupulona e, 31-33% de N+adlupulona), além ter mostrado, *in vitro*, as atividades antioxidante (>85 AA% de DPPH) e antibacteriana (128-1024 μg/mL) para bactérias do gênero *Staphylococcus, Pseudomonas, Escherichia e Bacillus).* Além disso, a atividade hemolítica foi considerada baixa (0-40%). As características químicas e farmacológicas encontradas na variedade de lúpulo brasileiro foram consideradas desejáveis para que sua resina possa ser considerada como matéria prima para as indústrias de alimentos, bebidas e produtos farmacêuticos. Resultados de análises estatísticas multivariadas por ACP indicaram que há diferenças significativas nas características químicas e farmacológicas entre a variedade de lúpulo cultivado no Brasil e a variedade comercial importada dos EUA.

Palavras-chave:*Humulus lupulus* Columbus, resina, atividade antioxidante e antimicrobiana, citotoxicidade.

1. Introdução

O Lúpulo (*Humulus lupulus* L.) é matéria prima utilizada em larga escala na produção de cerveja, uma vez que o mesmo atribui à bebida características organolépticas de aroma e amagor. É nas inflorescências da planta onde são sintetizados e armazenados metabólicos secundários (óleo essencial, resina e compostos fenólicos), devido à presença de glândulas de lupulina. A resina é a fração responsável pelo amargor, correspondendo cerca de 15 a 30% do peso total dos lúpulos secos, podendo ser divida em resina macia (mole) (10-25%) e resina dura (3 e 5%), segundo a American Society of Brewing Chemists, tanto a resina macia, quanto a resina dura, são solúveis em éter e metanol a frio, no entanto apenas a resina macia é solúvel em hexano (Almaguer *et al*., 2014; Taniguchi *et al*., 2014).

As resinas macias são divididas em subfrações de α-ácidos (humulonas) e β-ácidos (lupulonas). A subfração de α-ácidos é constituído por uma mistura de compostos homólogos e análogos, dentre eles, a humulona (35-70% do total de α-ácidos), a cohumulona (20-55%), a adhumulona (10-15%), a prehumulona (1- 10%) e a poshumulona (1-3%). A subfração β-ácidos é representada por uma mistura de análogos de lupulona (30-55% do total de β-ácidos), colupulona (20-55%), adlupulona (5-10%), prelupulona (1-3%) e poslupulona (ainda em quantidades não estabelecidas) (Durello *et al*., 2019; Karabín *et al*., 2016).

Além de amargor outras características são atribuídas à resina, como antioxidante, antimicrobiana, sedativas leves, além de exibir bioatividade contra vários distúrbios humanos, como câncer, diabetes, osteoartrite, osteoporose e doença cardiovascular, tudo isso devido não só a composição análoga de α-β-ácidos, mas tanto também aos compostos de prenilflavanonas, como por exemplo, xanthohumol de significativo potencial antioxidante, e o isoxanthohumol de efeito pró-estrogênico (Almaguer *et al*., 2014;Durello *et al*., 2019;Karabín *et al*., 2016; VanCleemput *et al*., 2009).

O lúpulo é atualmente encontrado em diferentes formas, podendo ser adquiridos como cones inteiros, pellets, pellets enriquecidos com resina, extratos, fração óleo essencial e derivados de ácido de lúpulo. Essa diversas formas de se encontrar o lúpulo tem como finalidade, atribuir aos produtos que o utiliza, amargor e aroma específico, estabilidade a luz e aumento do potencial bioativo (Ting*et al*., 2017).

No entanto a composição da resina total do lúpulo é diretamente influenciada pelo país de origem da planta, juntamente com o modo de cultivo, clima, solo, período da colheita e armazenamento (Almaguer *et al*., 2014; Bocquet *et al*, 2018; Sharp, 2016). Sendo assim esse trabalho teve como objetivo analisar qualitativamente e quantitativamente por CLAE o α-ácidos (cohumolona, n+adhumulona) e β-ácidos (colupulona e n+adlupulona) da resina do lúpulo cultivado no Brasil em cones e compará-lo com o lúpulo cultivano EUA em pellets, ambos da variedade Columbus, realizando posterior análise dos componentes principais (ACP), para identificar os fatores que influenciam na diferença e semelhança entre as amostras. Por fim, analisar possíveis influências da composição química com o seu potencial biológico, através da determinação do potencial antioxidante, antimicrobiano e citotóxico.

2. Materiais e métodos

2.1 Produtos químicos e reagentes

O metanol, éter dietílico, ácido clorídrico, ácido Trifluoroacético (TFA), Folin-Ciocalteu, DPPH (2,2- difenil-1-picrilhidrazilo), ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)6-ácido sulfônico), dimetilsulfóxido (DMSO), tween 80, droga padrão cloranfenicol, Triton X-100, Caldo *Brain Heart Infusion* (CBHI), *Brain Heart Infusion (*BHI) e Agar Sabouraud Dextrose (ASD)/(DIFCO Laboratories/USA/France), RPMI/sem bicarbonato e resazurina sódica, foram adquiridos da Sigma-Aldrich (São Paulo, SP, Brasil). Padrão de α- e β-ácidos ICE-3 grau HPLC da *American Society of Brewing Chemists (ASBC).*

2.2. Amostras de Lúpulo

Os lúpulos em flor foram adquiridos diretamente com o produtor da cidade de Campo Largo-PR-Brasil (25° 27′ 32″ Sul, 49° 31′ 55″ Oeste), onde foram colhidos em abril de 2018, no período da primavera, onde a temperatura máxima era de 22,3 ºC e mínima de 13,7 ºC. Os mesmos foram secos com ventilação forçada até eliminar 75% de umidade e posteriormente embalada a vácuo e encaminhados via sedex ao laboratório para análise, sendo mantidas congeladas a uma temperatura abaixo de 0 ºC até posterior utilização. Essas amostras do lúpulo em flor foram utilizadas em três formas, in natura (RCN), seca em estufa a 35 ºC (RCE) e liofilizadas (RCL) ambas por 24 h.

Já o lúpulo do EUA industrializado (RCP) na forma de pellets (T90) foi adquirido em uma empresa fornecedora. Os lúpulos em pellets tipo 90 são produzidos através da moagem do lúpulo em moinho de martelo e a prensagem do pó num pelletizador, sendo os pellets embalados em atmosfera inerte. É denominado de pellets (T90) por conter aproximadamente 90% dos componentes não resinosos encontrados no cone.

2.3. Extração da resina

Inicialmente foi realizado um pré-tratamento nas amostras do lúpulo para obtenção da resina. O lúpulo cultivado no Brasil adquirido em flor foi utilizado em três formas, *in natura* (RCN), seca em estufa a 35 ºC (RCE) e liofilizada (RCL) ambas por 24 h. Posteriormente, pesou-se 5 g da flor do lúpulo, adicionou-se 10 mL de metanol e 50 mL de éter dietílico e deixado sobre agitação durante 30 minutos, após esse período foi adicionado 20 mL de ácido clorídrico (0,1 M) e levado novamente à agitação por mais 10 minutos. Após a separação das fases, coletou-se 2,5 mL do sobrenadante e adicionou ao balão volumétrico de 25 mL e completou com metanol. O mesmo procedimento foi realizado para a extração da resina dos pellets (RCP).

2.4. Identificaçao e quantificação de humulonas e lupulonas

A identificação e quantificação de humulonas e lupulonas foram realizadas utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em regime de fase reversa, com detector de UV-Vis. Na fase móvel foram utilizadas 85% metanol e 15% fase ácida (TFA e água milli-Q). Foi utilizada a uma coluna cromatográfica Shim-pack PREP-ODS(H) 5 µm de tamanho de partícula 4,6 X 250 mm em temperatura de 22 °C e detector a 314 nm, onde foi injetado um volume de 20 uL de cada amostra (RCN, RCE, RCL e RCP). A identificação dos compostos cohumolona, n + adhumulona, colupulona e n + adlupulona foi feita pela co-injeção com os padrões autênticos e sua quantificação feita pela base das áreas obtidas. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

O padrão ICE-3 foi preparado adicionando 30 mL de metanol em cerca de 0,5 g de amostra do padrão, e depois levado ao banho de ultrassom para total dissolução. A mistura foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL e o volume completado com metanol, 10 mL desta solução foi pipetada em um balão volumétrico de 50 mL, completando seu volume com metanol. A solução foi homogeneizada e filtrada em membrana filtrante de 0,45 µm e injetada no CLAE.

2.5. Análise multivariada de dados das Resinas

As relações quimiotípicas entre os genótipos de lúpulo foram investigadas pela técnica multivariada conhecida como análise de componentes principais (ACP). Essa análise multivariada foi aplicada para avaliar diferenças e similaridades na composição química das amostras de resina extraída (RCN, RCE, RCL e RCP). Permitindo realizar uma análise simplificada e clara de um conjunto de dados complexos, identificando as componentes responsáveis pelas maiores variâncias entre os resultados, sem perdas significativas de informações. Para isso foram utilizados os softwares Excel® 2013 para cálculo dos parâmetros estatísticos básicos e Statistica®12 para as análises multivariadas de dados.

2.6. Fenólicos totais (Folin-Ciocalteau)

O conteúdo total de fenólicos foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu adaptado (Rossi; Singleton, 1965). Resumidamente, as amostras de resina de lúpulo (0,1 mL) foram misturadas a 0,1 mL de reagente Folin-Ciocalteau e 0,2 mL de solução de carbonato de sódio (4%). A mistura foi agitada em uma incubadora shaker (Solab, SL 222, Piracicaba, Brasil); após agitação, o extrato foi centrifugado (I 206, equipado com rotor ST-720m,

Tecnal, São Paulo, Brasil) a 5.000 rpm a 25 ° C por 10 min e mantido a 25 ° C por 30 minutos no escuro. A absorbância da amostra foi medida por espectrofotômetro (UV-340G, Gehaka, São Paulo, Brasil) a 750 nm contra um branco (0,1 mL de reagente Folin-Ciocalteau e 0,2 mL de solução de carbonato de sódio (4%)). Soluções aquosas de ácido gálico foram usadas como padrão e sua curva de calibração foi usada para determinar o conteúdo total de compostos redutores presentes na amostra (Figura 1). Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico por 100 gramas de resíduos (mg EAG/100 g). Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

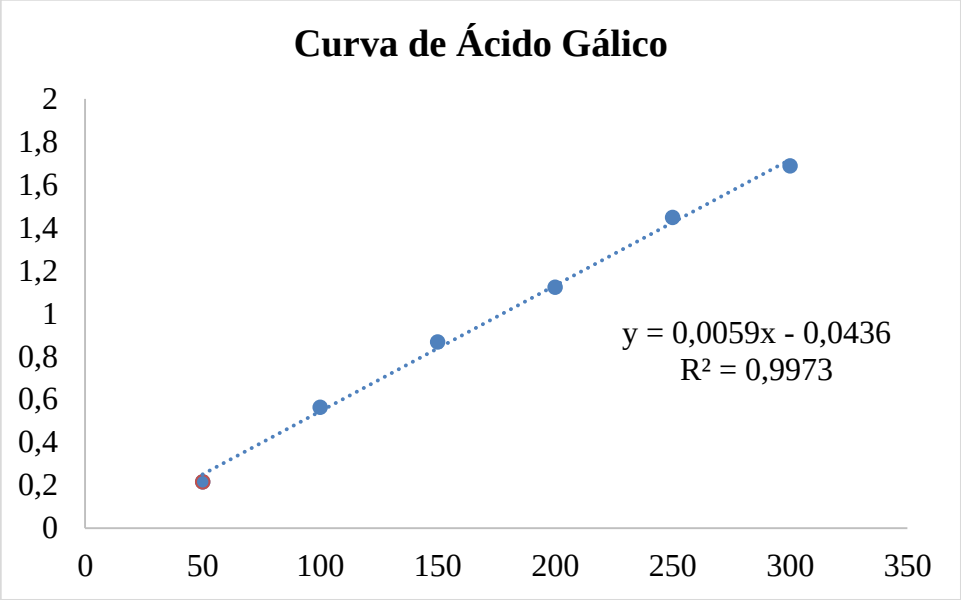


Figura 2. Curva de calibração para determinar o conteúdo total de compostos redutores

2.7. Ensaio de atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi determinada pelos métodos DPPH e ABTS. A DPPH foi estimado pela metodologia de Brand-Williams *et al.*(1995) com pequenas modificações. A solução de DPPH (0,06 mM) foi diluída com etanol para obter uma absorbância de 0,70 ± 0,02 unidades a 517 nm. As amostras de resina (0,1 mL) foram deixadas reagir com 3,9 mL da solução radical DPPH por 30 minutos no escuro, e a diminuição da absorbância da solução resultante foi observada. A absorbância da mistura de reação foi medida utilizando um espectrofotômetro (UV-340G, Gehaka, São Paulo, Brasil) a 517 nm. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. O monitoramento da diminuição da absorbância da reação entre a solução de DPPH• e a amostra foi determinada como porcentagem de inibição, sequestro ou eliminação do radical DPPH•, que pode ser obtido pela Equação 1:

$$\% \text{ de inibição do radical DPPH•} = \frac{(\text{Acontrole} - \text{Aamostra})}{\text{Acontrole}} \text{ X } 100 \qquad (2)$$

Onde, $A_{amostra}$ é a absorbância da reação entre a solução do radical DPPH• e a amostra antioxidante (resina) e $A_{controle}$ é a absorbância do radical DPPH•.

Para o teste ABTS, o procedimento seguiu o método de Rice-Evans *et al*. (1996) com pequenas modificações. O cátion do radical ABTS (ABTS +) foi gerado pela reação de 5 mL de solução aquosa de ABTS (7mM) com 88 µl de persulfato de potássio 140 mM (concentração final de 2,45 mM). A mistura foi mantida no escuro por 16 h antes do uso e depois diluída com etanol para obter uma absorbância de 0,70 ± 0,05 unidades a 734 nm usando um espectrofotômetro (UV-340G, Gehaka, São Paulo, Brasil). Em seguida, 30 µL da resina foram adicionadas em 3,0 mL de solução ABTS diluída. Após a adição de 30 µL de resina, a absorbância a 734 nm foi registrada aos 6 minutos após a mistura. Soluções etanólicas de concentrações conhecidas de Trolox foram usadas para calibração e todos os ensaios foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos em µMTrolox/g (Figura 2).

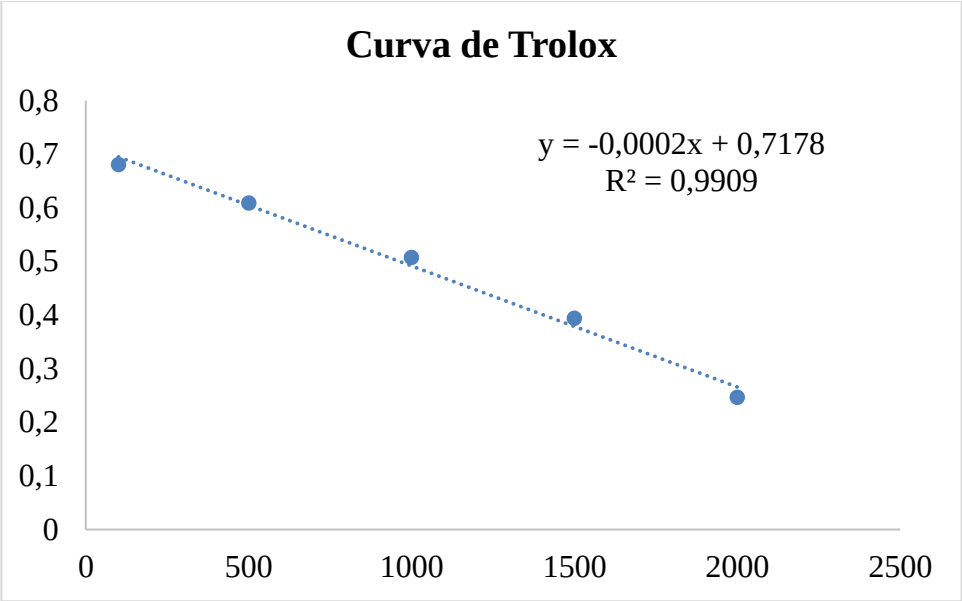


Figura 2. Curva de calibração para determinar a inibição radical ABTS

2.8. Ensaio de atividade antibacteriana

Os ensaios de atividade antibacteriana das resinas do lúpulo Columbus foram realizados pela pesquisadora Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima no Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

As amostras da resina do lúpulo Columbus (RCN RCE, RCL e RCP) foram solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO) a uma proporção de 5% e tween 80 a 0,02%. Em seguida, foi completado o volume final com água destilada esterilizada (q.s.p. para 3 mL) para obter uma emulsão na concentração inicial de 1024 µg/mL e diluições subsequentes até 4 µg/mL ((Cleland & Squires, 1991; Nascimento *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2014). As misturas foram agitadas durante 3 minutos em um aparelho Vortex (Fanem® Ltda., Guarulhos, SP, Brasil). As emulsões dos produtos utilizadas nos ensaios antibacterianos foram preparadas no momento da execução dos testes. Para o controle antibacteriano, foram usados como droga padrão cloranfenicol 100/bactérias e nistatina/leveduras nas mesmas condições. Os produtos foram adquiridos na Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA).

2.8.1. Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados nos ensaios para avaliação da atividade antibacteriana foram: *Brain Heart Infusion (*BHI) e Agar Sabouraud Dextrose (ASD) (Difco Laboratories Ltd, Detroit, EUA) para manutenção das cepas, e BHI e meio RPMI 1640 com L-glutamina e sem bicarbonato (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA). Os meios foram solubilizados em água destilada e esterilizados em autoclave a 121 °C, durante 15 min, de acordo com as instruções dos fabricantes.

2.8.2. Bactérias

Para os ensaios de atividade antibacteriana das amostras dos óleos, foram utilizadas as seguintes cepas:

-Bactérias: *Staphylococcus aureus* ATCC-25923, *S. aureus* LM-314, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-25853, *P. aeruginosa* ATCC-9027; *Escherichia coli* ATCC-18739, *E. coli* LM-362, *S. epidermidis* ATCC-12228, *Bacillus subtilis* ATCC-6633;

As bactérias utilizadas pertencem a MICOTECA do Laboratório de Micologia, Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF), Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba. Todas as cepas foram mantidas em *Brain Heart Infusion (*BHI)/bactérias (DIFCO Laboratories/USA/France), os quais foram preparados segundo as descrições dos fabricantes. As cepas foram mantidas em BHI e ASD à temperatura de 4 °C. Foram utilizados para os ensaios, repiques de 24-48 horas em ASD/BHI, incubados a 35 ± 2 °C.

2.8.3. Inóculo

Para preparação do inóculo, as colônias obtidas de culturas das cepas bacterianas foram suspensas em solução fisiológica estéril de NaCl (0,85% p/v) e ajustadas de acordo com o tubo 0,5 da escala padrão de McFarland para obtenção de 10^6 Formadoras de Colônia por mL (UFC/mL) (NCCLS, 2000; Hadacek & Greeger, 2000; Cleeland & Squires, 1991; Antunes *et al.*, 2006; Freire *et al.*, 2014). A quantificação do inóculo foi confirmada por meio do plaqueamento de 0,01 mL das suspensões em ASD. As placas foram incubadas a 28 ^{o}C e examinadas diariamente para a contagem das colônias, determinando o número de UFC/mL.

2.8.4. Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM)

Os ensaios de atividade antibacteriana foram realizados conforme os protocolos de Cleeland e Squires (1991) e NCCLS/CLSI (2002). A determinação da CIM das resinas sobre cepas de bactérias foram realizadas através da técnica da microdiluição em caldo em placa para cultura de células (TPP/ Switzerland/Europa) contendo 96 poços. Inicialmente, foram distribuídos 100 µL de RPMI/BHI duplamente concentrado nos orifícios das placas de microdiluição. Em seguida, 100 µL da emulsão dos produtos preparados duplamente concentrados, foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa e por meio de uma diluição seriada a uma razão de dois, foi obtida concentrações de 1024 µg/mL até 4 µg/mL. Por fim, foi adicionado 10 µL das suspensões das cepas de bactérias nas cavidades, onde cada coluna da placa refere-se, especificamente, a uma cepa. Paralelamente, foram realizados os controles de viabilidade de microrganismos (BHI + bactérias), esterilidade dos meios de cultura (RPMI/BHI) e controles negativos utilizando antimicrobianos padronizados, conforme cada gruo de micro-organismo. Para verificar a ausência de interferência nos resultados pelos solventes utilizados na preparação da emulsão (DMSO e Tween 80), foi feito um controle no qual foram colocados nas cavidades da microplacas o meio RPMI 1640, DMSO a 5%, Tween 80 a 2% e o inóculo bacteriano.

O ensaio foi realizado em triplicata. As placas preparadas assepticamente fechadas foram incubadas a 35 ± 2 °C durante 24-48 h e a temperatura ambiente (28 ± 2 °C) durante 7dias. No caso do ensaio com espécies bacterianas, após o tempo de incubação foram adicionados 20 µL de resazurina sódica a 0,01 % (p/v), reconhecido como indicador colorimétrico de óxido- redução para bactérias. As placas foram novamente incubadas a 35 ± 2 °C durante 24-48 h. A leitura dos ensaios foi procedida por meio da visualização da mudança de coloração nas cavidades de azul para rosa, nos ensaios com bactérias. A CIM para cada produto foi definida como a menor concentração capaz de inibir visualmente o

crescimento microbiano e/ou verificado pela permanência da coloração do corante indicador de crescimento.

A atividade antibacteriana das resinas do lúpulo Columbus foram interpretados e considerados como ativo ou inativo, conforme os seguintes critérios: 50-500 µg/mL = forte/ótima atividade; 600-1500 µg/mL = moderada atividade; > acima de 1500 µg/mL = fraca atividade ou produto inativo (Holetz et al., 2002; Houghton et al., 2011).

2.9. Ensaio da avaliação citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade das resinas do lúpulo Columbus foram realizados pelo pesquisador Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho no Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG).

As resinas do lúpulo Columbus (RCN, RCE, RCL e RCP) foram solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO) a uma proporção de 10% e tween 80 a 0,02%. Em seguida, foram completados os volumes finais com água destilada esterilizada (q.s.p. para 3 mL) para obter uma emulsão em diferentes concentrações (50, 100, 500 e 1000 µg/mL). As emulsões foram preservados em frascos de vidro âmbar e mantidos sob refrigeração a 18 ^{o}C até o momento dos testes.

2.9.1. Eritrócitos humanos

Os eritrócitos humanos referentes aos tipos sanguíneos A, B e O foram oriundos de doadores saudáveis. Estes foram doados pelo Hospital Universitário da Universidade Federal de Campina Grande (HU-UFCG-PB-Brasil). A manipulação e o descarte dos eritrócitos foram realizados de acordo com as Normas de Segurança da referida unidade. O estudo foi aprovado pelo Comitê de ética em pesquisas com seres humanos do Centro Universitário de Patos (UNIFIP-Patos-PB-Brasil), sob o número de Protocolo 2.373.249.

2.9.2. Avaliação do potencial hemolítico em eritrócitos humanos

Amostras de sangue humano A, B e O foram misturadas com NaCl 0,9 % na proporção de 1:30 e centrifugadas a 2500 rpm durante 5 minutos para obtenção dos eritrócitos. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes e, o sedimento da última centrifugação ressuspenso em NaCl 0,9% para obter uma suspensão a 0,5%. As amostras das resinas do lúpulo Columbus em diferentes concentrações (50, 100, 500 e 1000 ug/mL) foram adicionadas à 2 mL da suspensão de eritrócitos para um volume final de 2,5 mL. Uma suspensão de eritrócitos foi utilizada como controle negativo (0 % de hemólise) e uma

suspensão de eritrócitos acrescida de Triton X-100 a 1% como controle positivo (100 % de hemólise). Após isso, as amostras foram incubadas por 1 hora à 22 ± 2 ºC sob agitação lenta e constante. Decorrido este tempo as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm durante 5 minutos e a hemólise quantificada por espectrofotometria em comprimento de onda de 540 nm (Rangel et al., 1997). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

2.9.3. Análise estatística

Todas as análises e testes foram realizados em triplicata, onde os dados foram tratados por regressão linear simples através do método one-way ANOVA, bem como por meio da utilização do *teste t de Student*. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando apresentarem $p<0,05$. A análise estatística foi feita utilizado o software GraphPadPrism5.0®.

3. Resultados e discussão

3.1. Composição química da resina do lúpulo (humulonas e lupulonas)

Os ácidos amargos do lúpulo consistem nas frações de α-ácidos (humulonas) e β-ácidos (lupulonas), que são ambos caracterizados como derivados prenilados do floroglucinol, e são encontrados na fração resinosa que é sintetizada pelas glândulas de lupulina e solúvel em solventes orgânicos. Existem parâmetros que influenciam na extração desses α-β-ácidos, dentre eles esta a boa escolha do solvente. Estudos demostraram a boa eficiência da utilização de éter dietílico puro, no entanto devido à alta inflamabilidade, uma mistura de éter diétílico e metanol é a escolha ideal para a extração desses compostos dos cones e pellets de lúpulo, o que foi confirmado com a identificação dos compostos, cohumolona, n+adhumulona, colupulona e n+adlupulona juntamente com a co-injeção dos padrões autênticos utilizando o CLAE (Figura 3 e 4) (Čulík *et al*., 2009).

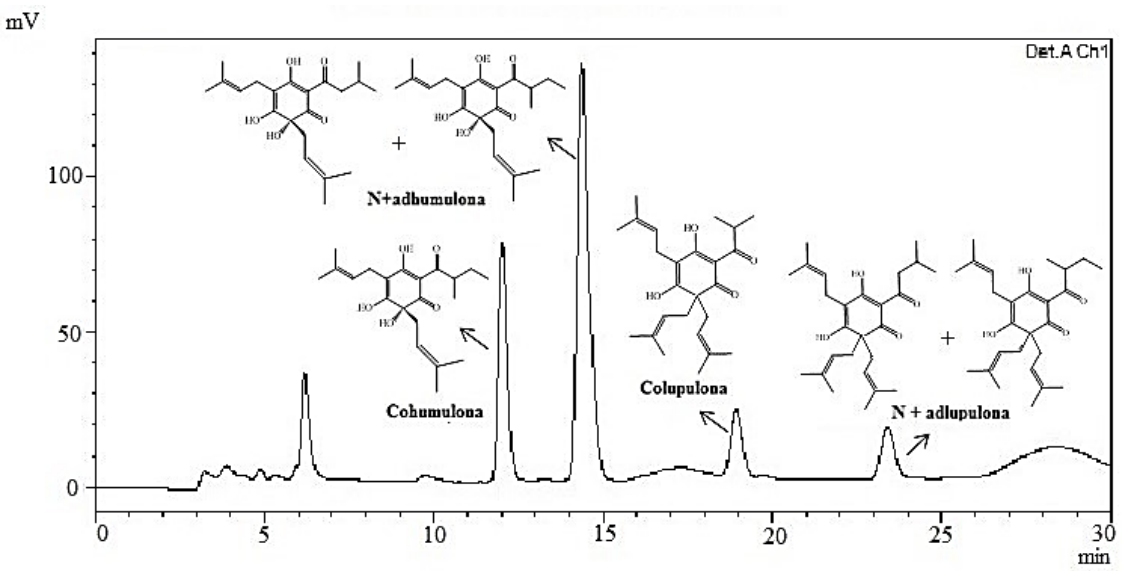


Figura 3. Cromatograma de CLAE do padrão autêntico α-β-Ácido (ICE-3)

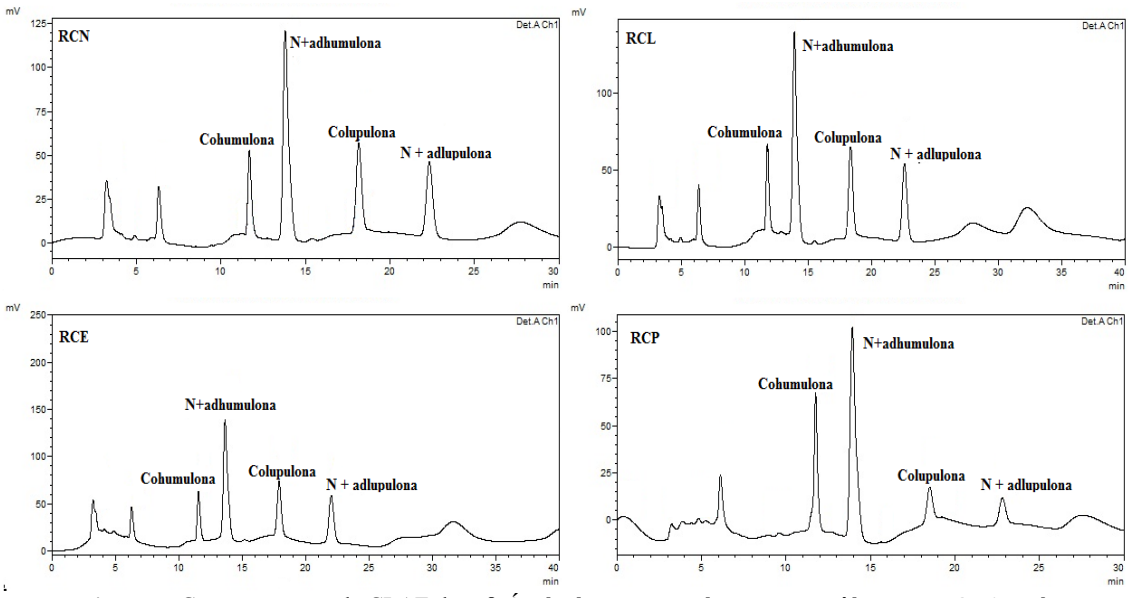


Figura 4. Cromatogramas de CLAE de α-β-Ácido das amostras de resina extraída com MeOH/DiEth

As análises quantitativas e qualitativas dos ácidos do lúpulo são atualmente realizadas por CLAE, promovendo uma boa separação desses e de outros compostos presentes na resina (Bertelli*etal*., 2018; Killeen *et al*., 2016; Prencipe *et al*., 2014; Taniguchi *et al*., 2013). Como pode ser observada nos cromatogramas nas amostras de resina (RCN, RCL, RCE e RCP) (Figura 19 e 20), a ordem de eluição seguiu a ordem descritas em outros estudos (Česlová *et al*., 2009; De Keukeleire *et al*., 2003), sendo ela: cohumulona, $t_R \cong 12$ min; N+adhumulona (humulona + adhumulona), $t_R \cong 14$ min; colupulona, $t_R \cong 18$ min; N+adlupulona (lupulona + adlupulona), $t_R \cong 24$ min. Obtendo a mesma ordem de eluição do padrão autêntico (ICE-3) e

semelhante tempo de retenção. Os compostos humulona e adhumulona assim como, lupulona e adlupulona, são isômeros estruturais de possível separação, no entanto os seus padrões individuais não são facilmente acessíveis, além de não ser necessária a análise separada desses compostos nesse trabalho.

A concentração percentual dos compostos identificados nas frações de α-β-ácidos da resina (Tabela 1), foi obtida pela curva de calibração não-linear (função inversa da parábola), através da injeção de diferentes concentrações do padrão de ICE-3 de composição: 13,88% de cohumulona, 30,76% de n+adhumulona, 13,44% de colupulona e 10,84% de n+adlupulona. Totalizando 44,64% de α-ácidos e 24,28% de β-ácidos (ASBC). A curva de calibração não-linear (Figura 5) foi utilizada para tentar eliminar a falta de ajuste, estudo já demostraram que esse tipo de calibração é específico para comportamento de dados homocedásticos, ou seja a medida que os valores do eixo X (concentração) aumenta, aumenta também a variância dos dados (Oliveira & de Aguiar, 2009).

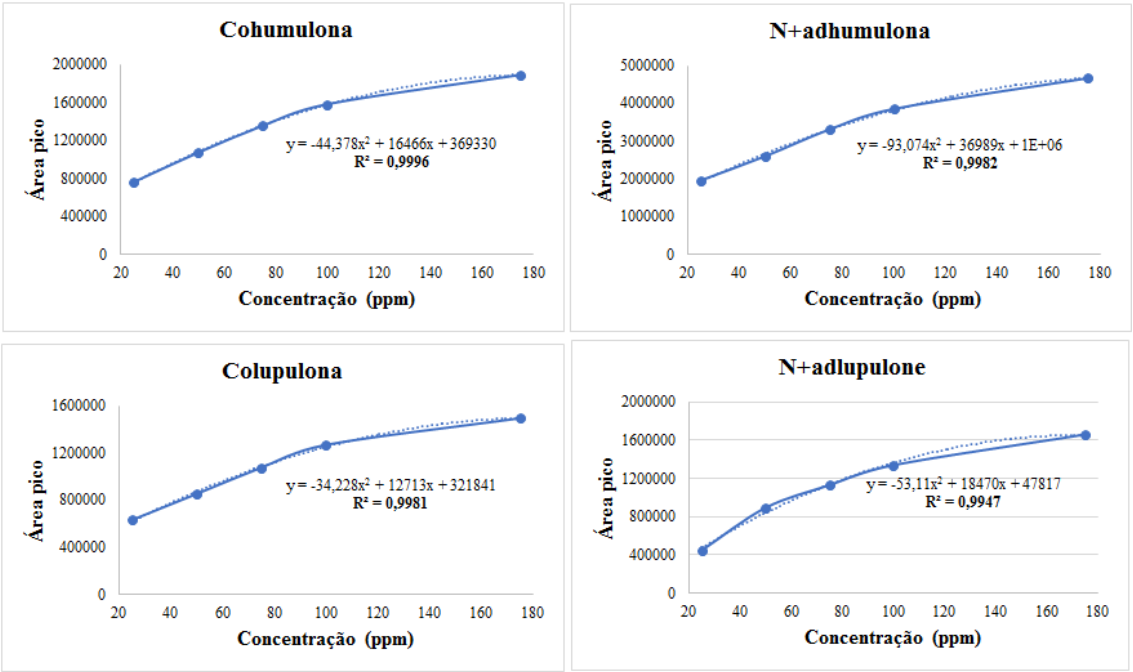


Figura 5. Curvas de calibração não-linear (função inversa da parábola), através da injeção de diferentes concentrações do padrão de ICE-3 (25 ppm; 50 ppm; 75 ppm; 100 ppm; 175 ppm)

De acordo com a literatura os ácidos amargos são responsáveis por 10 a 20% do peso dos cones de lúpulo seco, sendo os α-ácidos representados por três compostos principais, humulona (35-70% do total de α-ácidos), a cohumulona (20-55%), e a adhumulona (10-15%). Enquanto que os β-ácidos são representados por, lupulona (30-55% do total de β-ácidos), colupulona (20-55%), adlupulona (5-10%) (Durello *et al*., 2019;Karabín *et al*., 2016).

Tabela 1. Concentração percentual das frações de α-β-ácidos da resina

	α-Ácido (%)		β-Ácido (%)	
	Cohumulona	N+adhumulona	Colupulona	N+adlupulona
RCN	10,54	20,93	36,33	32,20
RCL	10,95	19,00	38,94	31,10
RCE	11,38	19,00	37,24	32,35
RCP	44,83	36,89	5,34	12,93

Segundo os resultados encontrados a concentração percentual de cohumulona das amostras de resina extraída do lúpulo cultivado no Brasil (RCN, RCL e RCE), está abaixo do valor esperado, já a resina extraída do lúpulo cultivado no EUA esta de acordo com os valores descritos na literatura e apresentou percentual acima do estabelecido para a variedade Columbus (29–34%) (Hopsteiner, 2011; Hopunion, 2011). No entanto o percentual de colupulona encontrado nas amostras de resina (RCN, RCL e RCE), está entre os parâmetros esperados, enquanto que na RCP se encontra abaixo. Alguns fatores podem influenciar na diferença de composição percentual de humulonas e lupulonas, dentre elas, geografia, solo, período em que o lúpulo foi colhido. Além disso, as humulonas são propensas a sofrer degradações durante o armazenamento do lúpulo, o que pode ter acontecido com o lúpulo cultivado no Brasil adquirido em flor, uma vez que na forma peletizada do lúpulo é possível manter uma melhor estabilidade dos compostos, evitando perdas e degradação (Almaguer *et al*., 2014; Salanţă *et al*., 2015).

Estudo realizado com as variedades Columbus e Nagget, também cultivados no EUA, nos períodos de 1998 a 2002, apresentou concentração percentual de cohumulona (23-36%) menor que de colupulona (48-61%), assim como as amostra de resina extraída do lúpulo cultivado no Brasil (RCN, RCE e RCL) (Krofta, 2003).

As humulonas (cohumulona, n+adhumulona) são caraterizadas por atribuir amargor e as lupulonas (colupulona, n+adlupulona) por suas ações antimicrobianas, o que permite concluir que o lúpulo cultivado no EUA tem níveis de amargor mais elevado devido ao seu percentual de humulonas, do que lúpulo cultivado no Brasil (Durello *et al*., 2019).

3.2 Análise multivariada de dados das resinas

Análise de Componentes Principais (ACP) foi aplicada para avaliar os resultados de humulonas (cohumulona, n+adhumulona) e lupulonas (colupulona, n+adlupulona) encontrados nas 4 amostras analisadas (RCN, RCL, RCE e RCP) . Adicionalmente, levaram-se em consideração os métodos de tratamento no material vegetal antes da extração da resina com solvente orgânico (MeOH/DiEth) e o país onde o lúpulo foi cultivado. Desse modo, a

ACP foi executada com a intenção de investigar as semelhanças e diferenças entre as amostras, demostrando através de tabelas e gráficos, tendências significativas de correlações entre os dados (Jolliffe & Cadima, 2016).

Na Tabela 2 estão representados os valores associados às correlações entre as variáveis (α-β-ácidos) e as três componentes principais obtidas. Foram consideradas as variáveis com valor de correlação acima de 0,6 como contribuição significativa

Tabela 2. Valores para as correlações entre α-ácidos (humulonas) β-ácidos (lupulonas) da resina de lúpulo

	PC1	**PC2**	**PC3**
α-acid1	**0,9956**	-0,0839	-0,0393
α-acid2	**0,9953**	-0,0926	-0,0194
β-acid1	**-0,8202**	-0,5719	-0,0166
β-acid2	**0,9499**	-0,3088	0,0472

α-acid1(Cohumulona); α-acid2 (N+adhumulona);
β-acid1 (Colupulona); β-acid2 (N+adlupulona).

A significância das quatro primeiras PCs com seu autovalor é demonstrada através do gráfico de screen-plot (Figura 6). É possível observar que o grau de inflexão foi muito significativo nas duas primeiras PCs, obtendo 99,87% da variância dos dados. Algumas amostras de natureza biológica, como as analisadas neste trabalho, é uma matriz complexa e naturalmente algumas características químicas sofram modificações naturais, o que pode contribuir para a formação de clusters mistos dentro da ACP.

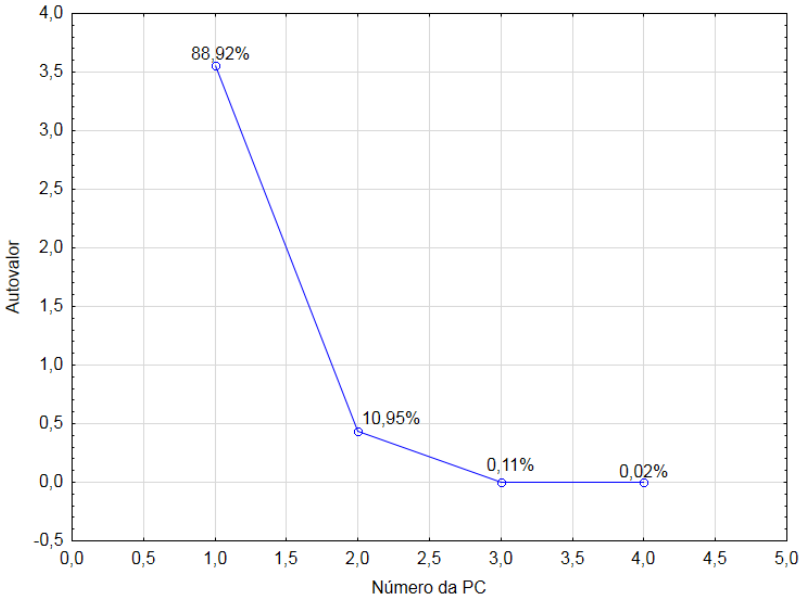


Figura 6. Screen-plot para os dados provenientes da análise elementar das amostras de resina

Nas Figuras 7 e 8 estão representados os gráficos dos escores e loadings com as PCs mais significativas (PC1 e PC2). Tais gráficos são aplicados como uma forma de identificar e expressar a variância dos dados destacando suas similaridades e diferenças entre as amostras.

De acordo com a Figura 23 foi observado que o tratamento usando ACP permitiu agrupar amostras com características similares bem como identificar diferenças entre as amostras de resina de lúpulo cultivado no Brasil e oriundo dos EUA. Na Figura 8 a projeção dos loadings sobre as PCs permite a avaliação da contribuição de cada variável (α-β-ácidos) na separação dos grupos.

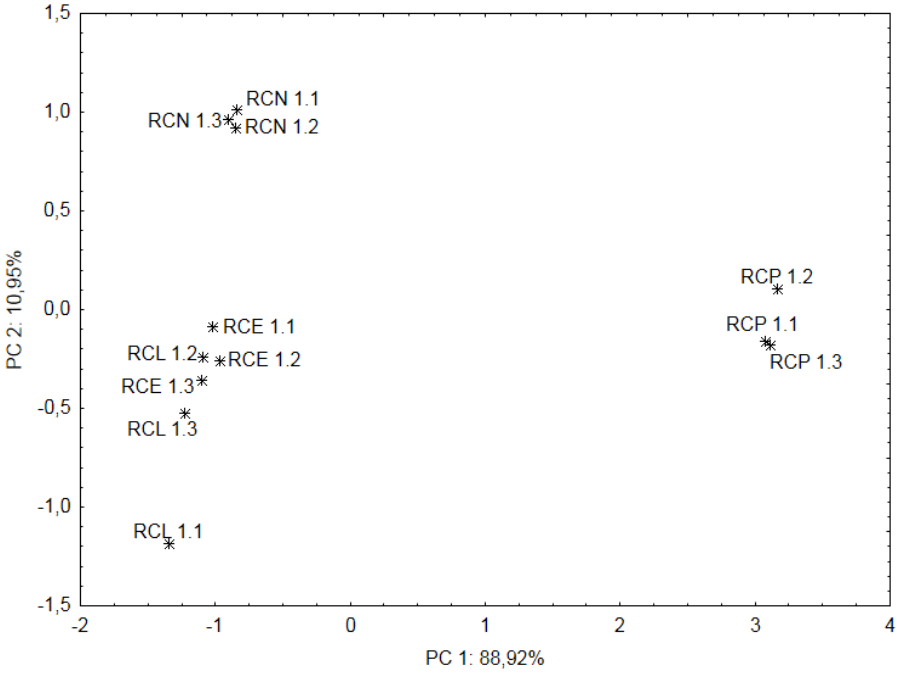


Figura 7. Gráfico dos escores da PC1 versus PC2 para as amostras da resina lúpulo

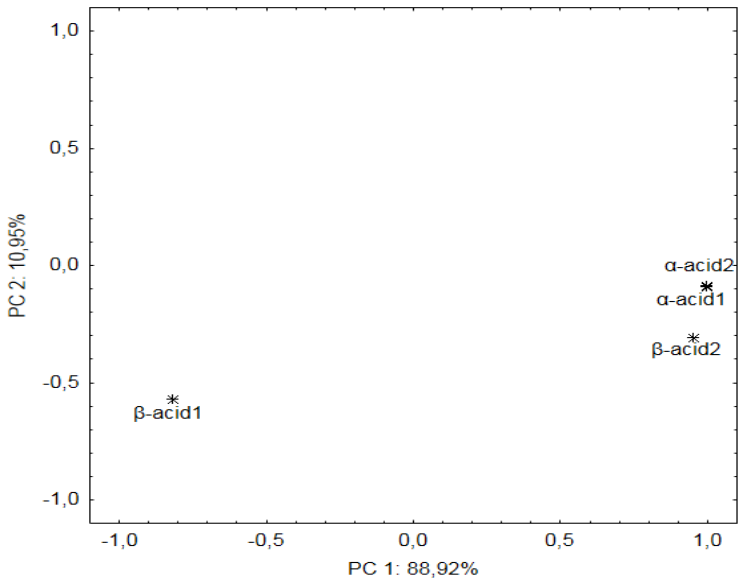


Figura 8. Gráfico dos loadings da PC1 versus PC2 para as amostras da resina de lúpulo

De modo geral é observada a formação de três grupos: i) RCN; ii) RCE e RCL e iii) RCP. Levando em consideração apenas o eixo da componente majoritária (PC1), é observado que existe similaridade entre as amostras RCN, RCE e RCL, ambas de origem brasileira, o que certamente favoreceu o agrupamento, considerando que os processos de cultivo, tipo de solo, período de colheita e armazenamento são os mesmo. Observando apenas o eixo da segunda componente principal (PC2), as amostras RCE, RCL e RCP se agrupam mais facilmente. De forma geral, existe uma similaridade muito grande entre as amostras RCL e RCE ao mesmo tempo em que há uma diferença significativa entre as amostras RCN e RCP, considerando as duas PCs representadas, o que esta relacionada ao processo de pré-tratamento antes da extração da resina e origem do lúpulo, respectivamente.

Através do ACP ficou claro que existe uma diferença significativa na concentração de α-β-ácidos (humulonas e lupulonas) do lúpulo cultivado no Brasil para o cultivado nos EUA, sendo as cohumulona e colupulona que mais influenciaram a diferenciação, o que pode está associado à geografia, solo, clima, época de colheita e degradações durante o armazenamento do lúpulo (Bocquet *etal*, 2018; Salanţă *et al*., 2015).

3.3. Ensaio de atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi determinada aplicando doi métodos espectrofotométricos, DPPH e $ABTS^+$, e um método espectrofotométrico indireto da avaliação da atividade antioxidante, fenólicos totais (Folin-Ciocalteau) (Tabela 3).

Foi observado que o teor de fenólicos assim como a atividade de inibição do radical $ABTS^+$, apresentou comportamentos semelhantes entre as amostras analisadas. Na amostra

RCN o teor de fenólicos totais foi consideravelmente menor que na amostra RCP, o que certamente pode está associado com a forma peletizada, ocorrendo o favorecimento da extração conjunta de compostos fenólicos do lúpulo (4% da massa seca das flores de lúpulo), como por exemplo, o prenilflavonoide xanthohumol, presente na fração da resina dura também solúvel em metanol e éter dietílico. Além disso, alguns estudos mostraram a relação do amargor com concentração de compostos fenólicos, ou seja, com o aumento da concentração de compostos fenólico há o aumento do nível de amargor do lúpulo (Durello *et al*., 2019; Hahn et al., 2018).

É importante salientar que o reagente de Folin-Ciocalteau, apresenta na sua composição, ácido fosfotúngstico e ácido fosfomolíbdico, que são reduzidos a partir dos extratos ou substâncias testadas, sendo um reagente não específico para grupos fenólicos, podendo sofrer interferências de outras substâncias redutoras presentes na amostra (Ikawa *et al*, 2003).

Tabela 3. Determinação da atividade antioxidante da resina de lúpulo

	Fenólicos Totais (mg EAG/g)	**ABTS (µMTrolox/g)**	**DPPH (AA%)**
RCN	18,97 ± 0,16	1287 ± 30	88,8 ± 0,84
RCL	32,47 ± 0,30	1422 ± 42	87,1 ± 0,94
RCE	26,48 ± 1,3	1509 ± 61	85,5 ± 1,7
RCP	371,2 ± 30	3489 ± 35	86,0 ± 1,7

Estudo realizado com extrato de lúpulo (29,16-36,62 mgEAG/g), apresentou teor de fenólicos equivalentes para RCL e RCE. Onde também foram encontrados concentrações significativas de Flavan-3-ols e proantocianidinas, Xantohumol e Taninos (Solarska & Sosnowska, 2015).

Para a percentagem inibitória do radical DPPH não foi observada diferenças significativas entre as amostras, o que pode estar relacionado com a acessibilidade do radical, sendo este um fator determinante da reação, onde pequenas moléculas, que têm melhor acesso ao radical, possuem relativamente maior atividade antioxidante (Magalhães *et al*., 2008).

Alguns estudos tem relatado o potencial antioxidante de compostos presente na resina de lúpulo, como por exemplo, a humulona que inibe peróxido de hidrogênio que induz a hemólise e lupulona demonstrou eliminar radicais DPPH, além disso, ambos compostos também inibiram a peroxidação lipídica. (Van Cleemput *et al*., 2009; Gorjanović *et al*., 2013). No entanto, em ambos os estudos realizados a inibição de radicais livres, frente aos α-ácidos era maior que em relação aos β-ácidos (IC50 de $3,2 \times 10^{-5}$ M e $2,5 \times 10^{-5}$ M para DPPH-

RSA), o que explica a diferença nos resultados de fenólicos totais e inibição do radical $ABTS^+$, entre as amostras, onde nas amostras RCN, RCE e RCL, a percentagem de α-ácidos foi muito menor que na amostra RCP.

3.4. Ensaio de atividade antibacteriana

Os resultados dos ensaios de atividade antibacteriana das amostras de resina (RCN, RCL, RCE e RCP) versus cepas de espécies bacterianas estão apresentados na Tabela 4. Foi observado que as amostras de resina inibiram o crescimento de algumas espécies bacterianas, em concentrações que apresentaram uma variação de CIM de 128 a 1024 µg/mL. As amostras de resina inibiram o crescimento de 50% das bactérias do gênero *Staphylococcus, Pseudomonas, Escherichia e Bacillus*.

Tabela 4. Avaliação da CIM (1024 a 4 µg/mL) da resina de lúpulo sobre bactérias

	Micro-organismos/CIM (µg/mL)							
Produtos (µg/ mL)	*S. aureus* ATCC-25923	*S. aureus M*-314	*P.aeruginosa* ATCC-25853	*P.aeruginosa* ATCC-9027	*E,. coli* ATCC-18739	*E. coli* LM-362	*S. epidermidis* ATCC-12228	*B.* subtilis ATCC-6633
RCN	512	128	128	256	256	256	1024	1024
RCL	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024
RCE	512	256	512	512	1024	1024	1024	1024
RCP	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024
Meio de cultura	-	-	-	-	-	-	-	-
Micro-orgaismo	+	+	+	+	+	+	+	+
Clorofenicol	256	256	512	512	1024	1024	256	512
Nistatina	NA	NA	NA-	NA-	NA-	NA-	NA-	NA

(+) Crescimento microbiano (-) Ausência de crescimento microbiano (NA): Não aplicado

Os resultados para a inibição do crescimento de algumas bactérias frente à RCN e RCE, ambas as amostras de resina extraído do lúpulo cultivado no Brasil, promoveram uma inibição mais significativa do crescimento de 50% das bactérias *S. aureus* ATCC-25923, *S. aureus M*-314, *P.aeruginosa* ATCC-25853, *P.aeruginosa* ATCC-9027, com variação de CIM de 128 a 512 µg/mL do que a amostra RCP e RCL. A RCN também apresentou inibição de crescimento significativo contra *E. coli* ATCC-18739; *E. coli* LM-362 na concentração de 256 µg/mL. A diferença do potencial de inibição de bactérias Gram-positivas entre as

amostras de resina do lúpulo brasileiro e do EUA pode está relacionada com a concentração percentual de algum composto presente na resina extraída.

Estudos mostraram que os ácidos amargos (α-β-ácidos), são os principais responsáveis pela atividade antimicrobiana da resina total, sendo que os derivados de lupulona tem potencial inibitório de bactérias Gram-positivas mais eficazes que os derivados de humulonas (Bocquet*et al*., 2018; Karabín *et al*., 2016) Isso explica porque a atividade antimicrobiana das resinas de lúpulo Columbus (RCN e RCE) foi considerada como forte/ótima (50-500 μg/mL) frente a algumas bactérias, em relação à resina extraída do lúpulo oriundo do EUA, considerada de moderada atividade (600-1500 μg/mL) (Holetz *et al*., 2002; Houghton *et al*., 2007).

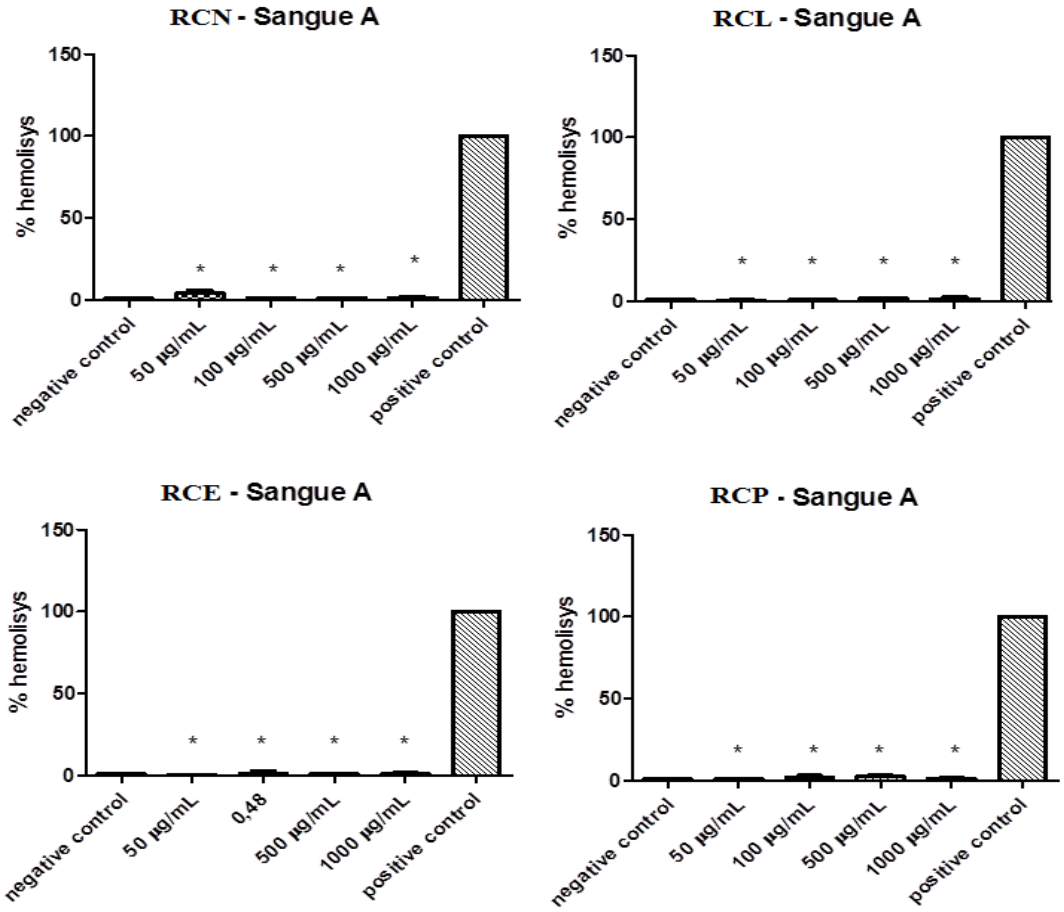
A amostra RCL não demostrou um mesmo perfil semelhante do potencia antibacteriano em relação às amostras RCN e RCE, ambas de origem brasileira, mesmo apresentando equivalente concentração percentual de lupulona, isso pode ter ocorrido porque outros compostos químicos podem ter sido extraídos em conjunto com os ácidos amargos e certamente o processo de liofilização pode ter degradado ou não possibilitado a extração desses compostos que também contribuíram para essa atividade antibacteriana.

3.5. Ensaio da avaliação citotoxicidade

Tratamentos terapêuticos a base de extratos de plantas são usados durantemuito anos na medicina popular, devido a presença de compostos químicos com grande potencial bioativo, porém o seu uso de forma descontrolada e em determinadas concentrações podem apresentam toxidade ao ser humano, é devido a isso que ensaios citotóxicos são importantes para prevenir intoxicações. Nesse estudo do óleo essencial de genótipos de lúpulo foi realizado um ensaio *in vitro* de citotoxicidade com células sanguíneas (eritrócitos humanos) apresentados na Figura 9, avaliando assim se existem possíveis efeitos danosos do produto oriundo do material vegetal à membrana celular dos eritrócitos (Rodrigues*et al*., 2010; Martins *et al*., 2012).

Por causa de seus efeitos antibacterianos e antioxidantes, os compostos de lúpulo também podem ser usados na medicina humana ou veterinária, além de aditivos em alimentos. Estudos mostram a eficiência do uso combinado de determinadas concentrações de alguns compostos de lúpulo (lupulina e xantohumol) e antibiótico frente algumas bactérias Gram-positivas, estudos como esses além de relacionar a concentração mínima para inibição de microrganismo, também leva em consideração a concentrações de forma individual de cada composto que possivelmente causaria alguma toxicidade ao ser humano (Natarajan*et al*.,

2008). Até hoje os estudos realizados para avaliar possíveis toxicidades dos compostos químicos do lúpulo in vitro e in vivo, são em sua maioria de resultados negativos (Karabín*et al*., 2016).



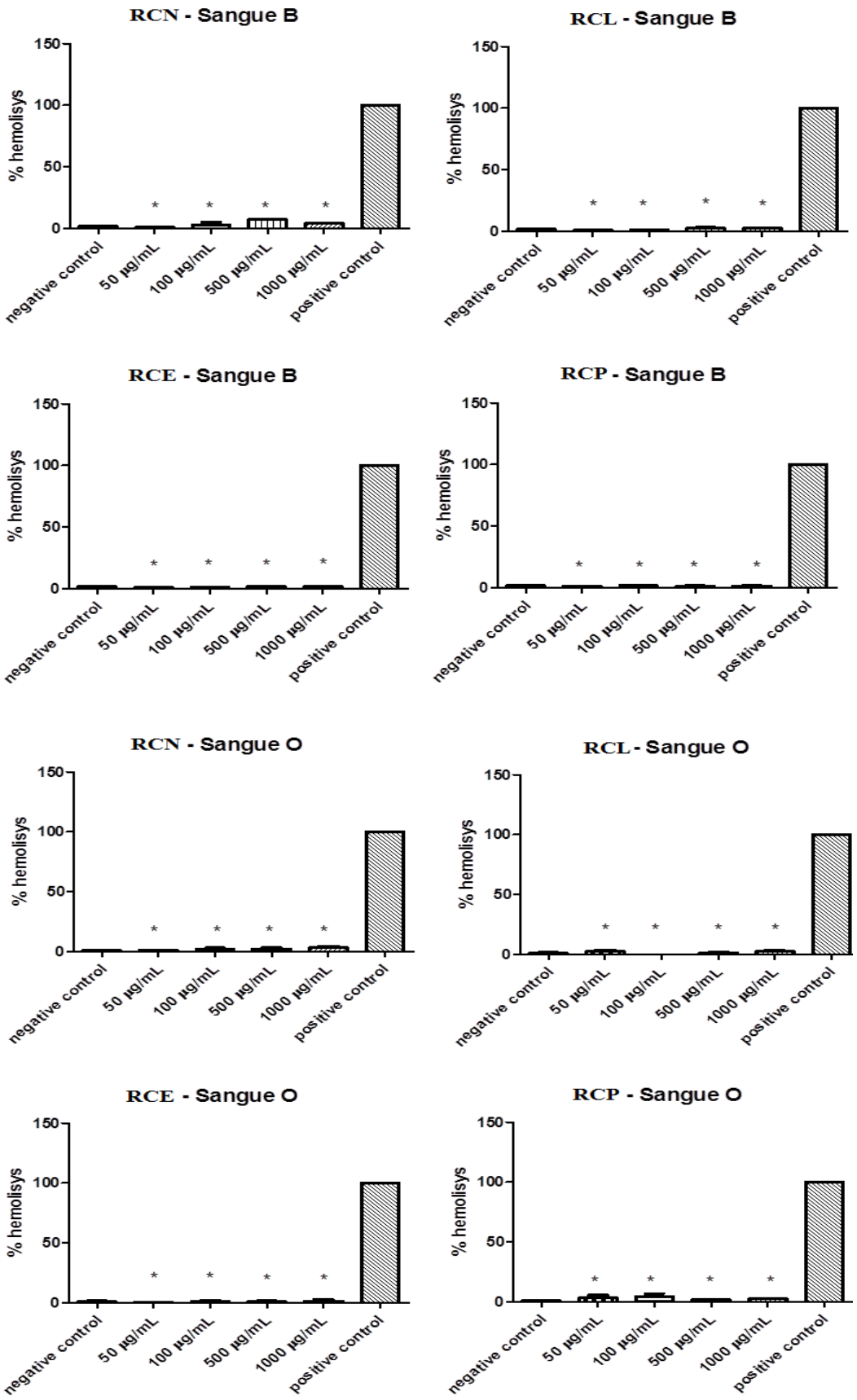


Figura 9. Avaliação da citotoxicidade da resinade lúpulo extraída com solvente orgânico em eritrócitos humanos. Eritrócitos tipo A, B, O; Controle negativo (eritrócitos 0.5%), Controle Positivo (1% Triton X-100). $P < 0.05$ (*), versus controle positivo.

O resultado da atividade hemolítica para todas as amostras de resina apresentados na Figura 7, mostra a concentração em média de porcentagem de hemólise repetida em três experimentos. De acordo com Rangel *et al*., (1997) o percentual de hemólise entre 0 a 40% pode ser considerado baixo, de 40 a 80% moderado e acima de 80% alto. Mesmo testando em diferentes tipos sanguíneos a todas as amostras até na maior concentração, não atingiu 40% de hemólise, sendo considerada de baixa citotoxicidade. Contudo, as informações sobre a segurança da administração diária de ácidos amargos por humanos são limitadas, não apresentando toxicidade até então, mas podendo causar irritação gastrointestinal (Karabín*et al*., 2016).

Considerações Finais

Nesse estudo foi possível analisar quantitativamente e qualitativamente das humulonas e lupulonas (α-β-ácidos) da resina extraída do lúpulo columbus em flor (cultivado no Brasil) e em pellets (cultivado do EUA) da variedade Columbus.

O método de extração desses α-β-ácidos por solvente orgânico (MeOH/DiEth) foi eficiente, possibilitando as análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLEA) em regime de fase reversa, com detector de UV-Vis, identificado e quantificando derivados de humulonas e lupulonas nas quatro amostras (RCN, RCE, RCL e RCP), fazendo uma análise do nível de amargor, além de evidenciar se houve perdas e possíveis degradações de alguns compostos durante o pré-tratamento do material vegetal. O que foi facilmente visualizado com a aplicação do ACP, mostrando que a concentração percentual de humulonas e lupulonas foi parâmetro para a diferenciação de cultivares de lúpulo.

O potencial biológico foi avaliado através da análise da atividade antioxidante, antimicrobiana e ensaio citotóxico (atividade hemolítica), onde foi visualizado que diferenças na composição de α-β-ácidos, podem influenciar no potencial biológico dessa resina, principalmente no que diz respeito à concentração de lupulona, influenciando significativamente no potencia inibitório de algumas bactérias Gram-positivas. Podendo concluir que devido seus efeitos antibacterianos e antioxidantes, compostos presentes na resina de lúpulo, como, humulonas e lupulonas, pode ser usados na medicina humana ou veterinária, além de aditivos em alimentos, uma vez que, segundo resultados apresentados aqui e em estudos anteriores, esses compostos não apresentam toxicidade ao ser humano.

Além disso, fica evidenciando o grande potencial antimicrobiano da resina extraída do lúpulo cultivado no Brasil, com concentrações consideráveis de lupulona, necessitando assim de maiores estudos futuros.

Agradecimentos

Os autores agradecem às agências de fomento FAPESB pelo suporte financeiro para as pesquisas realizadas e a CAPES pela bolsa de mestrado concedida.

Referências Bibliográficas

Almaguer, C., Schonberger, C., Gastl, M., Arendt, E. K., Becker, T (2014). *Humulus lupulus* – a story that begs to be told. *A review Inst. Brew*, *120*, 289. https://doi.org/10.1002/jib.160

Antunes, R. M. P., Lima, E. O., Pereira, M. S. V., Camara, C. A., Arruda, T. A., Catão, R. M. R., Barbosa, T. P., Nunes, X. P., Dias, C. S., Silva, T. M. S. (2006). Atividade antimicrobiana "in vitro" e determinação da concentração inibitória mínina (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.16, n. 4, p. 517-524. http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2007000400016

BarthHaas. (2020). Columbus Hopfen aus den USA. https://www.barthhaas.com/hopfensorte/columbus. Acesso em Julho 2020.

Bertelli, D., Brighenti, V., Marchetti, L., Reik, A., & Pellati, F. (2018). Nuclear magnetic resonance and high-performance liquid chromatography techniques for the characterization of bioactive compounds from *Humulus lupulus L.* (hop). *Analytical and Bioanalytical Chemistry, 410(15), 3521–3531*. http://dx.doi.org/10.1007/s00216-018-0851-y

Bocquet, L., Sahpaz, S., Hilbert, J. L., Rambaud, C., & Rivière, C. (2018). *Humulus lupulus L.*, a very popular beer ingredient and medicinal plant: overview of its phytochemistry, its bioactivity, and its biotechnology. *Phytochemistry Reviews*. http://dx.doi.org/10.1007/s11101-018-9584-y

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995).Use of free radical method to evaluate antioxidant activity.Lebensmittel – Wissenschaft und -*Technologie*, v. 22, p. 25-30.

Česlová, L., Holčapek, M., Fidler, M., Drštičková, J., & Lísa, M. (2009). Characterization of prenylflavonoids and hop bitter acids in various classes of Czech beers and hop extracts using high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A, 1216(43), 7249–7257*. http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2009.09.022

Cleland, R. & Squires, E. (1991).Evalution of new antimicrobials "*in vitro*" and in experimental animal infections. In: LORIAN, V. M. D. Antibiotics in Laboratory Medicine. Willians & Wilkins, p. 739-788.

Čulík, J., Jurková, M., Horák, T., Čejka, P., Kellner, V., Dvořák, J., Karásek, P., Roth, M. (2009). Extraction of Bitter Acids from Hops and Hop Products Using Pressurized Solvent Extraction (PSE). *Journal of the Institute of Brewing, 115(3), 220–225*. http://dx.doi.org/10.1002/j.2050-0416.2009.tb00372.x

De Keukeleire, J., Ooms, G., Heyerick, A., Roldan-Ruiz, I., Van Bockstaele, E., & De Keukeleire, D. (2003). Formation and Accumulation of α-Acids, β-Acids, Desmethylxanthohumol, and Xanthohumol during Flowering of Hops *(Humulus lupulusL.).Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(15), 4436–4441*. http://dx.doi.org/10.1021/jf034263z

Durello, R. S., Silva, L. M., Bogusz jr, S. (2019). Química do lúpulo. *Quim. Nova*, Vol. 42, No. 8, 900-919. Epub Oct 21, 2019. ISSN 1678-7064. https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170412

Freire, I.C.M., Pérez, A.L.A.L., Cardoso, A.M.R., Mariz, B.A.L.A., Almeida, L.F.D., Cavalcanti, Y.W., Padilha, W.W.N. (2014). Atividade antibacteriana de Óleos Essenciais sobre *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus. Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v.16 n.2. https://doi.org/10.1590/1983-084X/12_053

Gorjanović, S., Pastor, F. T., Vasić, R., Novaković, M., Simonović, M., Milić, S., & Sužnjević, D. (2013). Electrochemical versus Spectrophotometric Assessment of Antioxidant Activity of Hop *(Humulus lupulus L.)* Products and Individual Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61(38), 9089–9096.* https://doi.org/10.1021/jf401718z

Hadacek, F. & Greger, H. (2000). Testing of antifungal natural products: methodologies, comparatibility of results and assay choice. *Phytochemical Analyses*, v. 11, p. 137-147. https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1565(200005/06)11:3<137::AID-PCA514>3.0.CO;2-I

Hahn, C. D., Lafontaine, S. R., Pereira, C. B., & Shellhammer, T. H. (2018). Evaluation of Nonvolatile Chemistry Affecting Sensory Bitterness Intensity of Highly Hopped Beers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 66(13), 3505–3513.* https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05784

Hopsteiner, Hop Varieties, S.S. Steiner, Inc., New York 2011.

Hopunion, L., Hop Variety Handbook, Hopunion LLC, Yakima, Washington, DC 2011.

Ikawa, M., Schaper, T.D., Dollard, C.A., Sasner, J.J. (2003). Utilization of Folin-Ciocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds. *J. Agric. F. Chem.* 51, 1811-1815. https://doi.org/10.1021/jf021099r

Jolliffe, I.T. & Cadima, J. (2016). Principal component analysis: a review and recent developments, Phil. *Trans. R. Soc.* A 374, 1–15. https://doi.org/10.1098/rsta.2015.0202

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

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

Killeen, D. P., Watkins, O. C., Sansom, C. E., Andersen, D. H., Gordon, K. C., & Perry, N. B. (2016). Fast Sampling, Analyses and Chemometrics for Plant Breeding: Bitter Acids, Xanthohumol and Terpenes in Lupulin Glands of Hops *(Humulus lupulus). Phytochemical Analysis, 28(1), 50–57.* https://doi.org/10.1002/pca.2642

Krofta, K. (2003). Comparison of quality parameters of Czech and foreign hop varieties. *Plant, Soil and Environment*, 49(No. 6), 261–268. https://doi.org/10.17221/4123-pse

Magalhães, L.M.; Segundo, M.A.; Reis, S.; Lima. J.L.F.C. (2008) Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, Amsterdam, v.613, n. 1, p.1-19. https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.02.047

Natarajan P, Katta S, Andrei I, Ambati VBR, Leonida M, Haas GJ. (2008). Positive antibacterial co-action between hop (*Humulus lupulus*) constituents and selected antibiotics. Phytomedicine 15(3):194–201. https://doi.org/10.1016/j.phymed.2007.10.008

Oliveira, E. C., de Aguiar, P. F. (2009). Validação da metodologia da avaliação de incerteza em curvas de calibração melhor ajustadas por polinômios de segundo grau. *Quim. Nova*, Vol. 32, No. 6, 1571-1575. https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000600041

Prencipe, F. P., Brighenti, V., Rodolfi, M., Mongelli, A., dall' Asta, C., Ganino, T., Bruni, R., Pellati, F. (2014). Development of a new high-performance liquid chromatography method with diode array and electrospray ionization-mass spectrometry detection for the metabolite fingerprinting of bioactive compounds in *Humulus lupulus* L. *Journal of Chromatography A, 1349, 50–59.* https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.04.097

Rangel, M., Malpezzi, E. L. A., Susini, S. M. M., Freitas, J. C. Hemolytic activity in extracts of the diatom Nitzsnhia. *Toxicon*, v.35, 305-309, 1997. https://doi.org/10.1016/s0041-0101(96)00148-1

Salanţă, L.-C., Tofană, M., Socaci, S., Mudura, E., Pop, C., Pop, A., & Fărcaş, A. (2015). Determination of Volatiles in Hops from Romania by Solid Phase Fiber Microextraction and Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Analytical Letters, 49(4), 477–487.* https://doi.org/10.1080/00032719.2015.1075129

Sharp, D. (2016) Factors that influence the Aroma and Monoterpene Alcohol Profile of Hopped Beer. Dissertation, *Oregon State University*.

Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybidic-phosphotungstic acid reagent.American Journal of Enology and Viticulture, v.16, p.144-158.

Taniguchi, Y., Matsukura, Y., Ozaki, H., Nishimura, K., & Shindo, K. (2013). Identification and Quantification of the Oxidation Products Derived from α-Acids and β-Acids During Storage of Hops *(Humulus lupulus* L.*). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61(12), 3121–3130.* https://doi.org/10.1021/jf3047187

Taniguchi, Y., Taniguchi, H., Yamada, M., Matsukura, Y., Koizumi, H., Furihata, K., & Shindo, K. (2014). Analysis of the Components of Hard Resin in Hops *(Humulus lupulus* L.) and Structural Elucidation of Their Transformation Products Formed during the Brewing Process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 62(47), 11602–11612.* https://doi.org/10.1021/jf504394h

Ting, P. L., & Ryder, D. S. (2017). The Bitter, Twisted Truth of the Hop: 50 Years of Hop Chemistry.*Journal of the American Society of Brewing Chemists, 75(3), 161–180.* https://doi.org/10.1094/asbcj-2017-3638-01

Van Cleemput, M., Cattoor, K., De Bosscher, K., Haegeman, G., De Keukeleire, D., & Heyerick, A. (2009). Hop *(Humulus lupulus)*-Derived Bitter Acids as Multipotent Bioactive Compounds. Journal of Natural Products, *72(6), 1220–1230.* https://doi.org/10.1021/np800740m

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com esse trabalho foi possível observar a importância de uma prospecção para o desenvolvimento das posteriores análises, possibilitando associar os resultados de composição química da planta (resina e óleo essencial), juntamente com o seu potencial biológico com tendências de pesquisas encontradas durante o mapeamento acerca do uso e aplicação do lúpulo.

As diferenças na composição dos extrados de lúpulo podem influenciar no potencial biológico dos constituintes secundários da planta, além de sua característica organoléptica (aroma e amargor). Foram identificados muitos compostos com potencial bioativo nos extratos, o que gera um efeito de sinergimos, agregando ainda mais importância a essa planta para a indústria.

Foi possível também observar as diferenças e similaridades entre o lúpulo cultivado de forma ainda experimental no Brasil, com o lúpulo comercializado de padrões já estabelecidos de outro país. Mostrando que o lúpulo cultivado no Brasil apresenta um perfil volátil e níveis de ácidos amargos aceitáveis para futura comercialização de grande escala e estudos, principalmente no que diz respeito à formulação de medicamentos e aditivos em alimentos.