

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

**Caracterização Química e Avaliação da Bioatividade de Óleos Essenciais e de
Extratos Etanólicos de Lúpulos Cultivados na Zona da Mata Mineira**

Mayara Stefani Ventura Silva
Magister Scientiae

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2026**

MAYARA STEFANI VENTURA SILVA

Caracterização Química e Avaliação da Bioatividade de Óleos Essenciais e de Extratos Etanólicos de Lúpulos Cultivados na Zona da Mata Mineira

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Patricia Fontes Pinheiro

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

S586c
2026
Silva, Mayara Stefani Ventura, 1997-
Caracterização química e avaliação da bioatividade de óleos
essenciais e extratos etanólicos de lúpulos: cultivados na Zona da
Mata Mineira / Mayara Stefani Ventura Silva. – Viçosa, MG,
2026.

1 dissertação eletrônica (107 f.): il. (algumas color.).

Inclui apêndices.

Orientador: Patricia Fontes Pinheiro.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Química, 2026.

Referências bibliográficas: f. 90-100.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2026.515>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Essências e óleos essenciais - Análise. 2. Lúpulo -
Cultivo - Zona da Mata (MG : Mesorregião). 3. Alfa-ácido.
4. Beta-ácido. 5. Bioensaio. 6. Cromatografia líquida.
7. Cromatografia gasosa - Espectrometria de massas. I. Pinheiro,
Patricia Fontes, 1980-. II. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Química. Programa de Pós-Graduação em
Agroquímica. III. Título.

CDD 22. ed. 543.8

MAYARA STEFANI VENTURA SILVA

Caracterização Química e Avaliação da Bioatividade de Óleos Essenciais e de Extratos Etanólicos de Lúpulos Cultivados na Zona da Mata Mineira

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 31 de julho de 2026.

Assentimento:

Mayara Stefani Ventura Silva
Autora

Patricia Fontes Pinheiro
Orientadora

Essa dissertação foi assinada digitalmente pela autora em 03/09/2026 às 15:48:54 e pela orientadora em 03/09/2026 às 15:51:41. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **QAPL.BABE.Q4DP** e clique no botão 'Validar documento'.

Dedico este trabalho ao meu filho, minha maior motivação, e ao meu noivo, Leandro
(in memoriam), por todo amor, apoio e incentivo ao longo desta caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me conceder força, sabedoria e sustento ao longo de toda esta caminhada, renovando minhas esperanças a cada amanhecer. À Virgem Santíssima, por sua intercessão e por me proporcionar conforto e amparo nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais, expresso minha profunda gratidão pelo apoio incondicional, por acreditarem nos meus sonhos e por me proporcionarem a oportunidade de continuar minha trajetória acadêmica e profissional. Agradeço, de maneira especial, pelo cuidado e dedicação ao meu filho, gesto fundamental para que eu pudesse conduzir este trabalho.

Ao meu filho, dedico minha mais profunda e eterna gratidão pela compreensão diante das minhas ausências, pelo amor sincero, pela paciência e pelo incentivo constante. Mesmo nos momentos mais difíceis, sua existência foi minha maior fonte de força e motivação para nunca desistir dos meus sonhos. Cada conquista carrega o seu amor, que ilumina minha vida e dá sentido a todos os meus esforços. Você é, e sempre será, minha maior motivação.

Ao meu noivo, Leandro, que hoje descansa junto de Deus, minha eterna gratidão por todo o amor, companheirismo e apoio. Sua presença, seu carinho e os sonhos que compartilhamos foram forças nos momentos mais difíceis. Esta conquista também é sua, pois parte de tudo o que sou carrega o amor que vivemos. Onde quer que esteja, espero que se orgulhe desta realização. Sua memória será para sempre luz no meu caminho.

Aos meus amigos de trabalho Thalita, Deborah, Gabriel, Guilherme Ferraz e Guilherme Pereira, agradeço pelo apoio, companheirismo e amizade ao longo desta jornada. A convivência e o incentivo de vocês tornaram essa caminhada mais leve e especial.

Aos técnicos e amigos Jorge, Kleryton e José Neto, minha sincera gratidão pela valiosa colaboração no uso dos equipamentos, pela disponibilidade em auxiliar durante o desenvolvimento deste trabalho, pelos momentos de descontração e pelo apoio constante.

Agradeço ao professor Aldino (IFES) pelo valioso auxílio na compreensão da Análise de Componentes Principais, e ao professor Eraldo (Entomologia/UFV) por gentilmente disponibilizar o uso do HPLC. Sem o apoio e a parceria de ambos, este trabalho não teria sido possível.

Agradeço especialmente a Marcelo Amaral de Moura por ceder as amostras de lúpulo em pellets utilizadas neste estudo e pelo incentivo à pesquisa, fundamentais para a realização deste trabalho. Agradeço também ao Professor Alexandre Fontes Pereira pela indicação e apoio que possibilitaram esta importante parceria.

Ao Departamento de Bioquímica (UFV), em especial às professoras Michelle e Marisa e a toda a equipe envolvida, agradeço pela parceria na realização dos ensaios biológicos, pela dedicação e pelos conhecimentos compartilhados.

Aos meus amigos que, mesmo distantes, torcem por mim e me apoiam constantemente com palavras de conforto, carinho e incentivo, meu muito obrigada. Sem vocês essa caminhada seria muito mais difícil.

Manifesto minha sincera e profunda gratidão à minha orientadora, Professora Patrícia, por me acolher em seu laboratório e por ter sido muito mais que uma orientadora: uma grande amiga e fonte constante de apoio. Agradeço pela confiança, paciência, generosidade e por todos os ensinamentos compartilhados. Sua orientação e compromisso com a ciência foram essenciais para meu crescimento pessoal, acadêmico e profissional, contribuindo decisivamente para a construção da pesquisadora que me torno a cada dia.

Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes agências de pesquisa brasileiras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

“Para se ter sucesso, é necessário amar de verdade o que se faz. Caso contrário, levando em conta apenas o lado racional, você simplesmente desiste”.
(Steve Jobs)

RESUMO

SILVA, Mayara Stefani Ventura, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2026. **Caracterização Química e Avaliação da Bioatividade de Óleos Essenciais e de Extratos Etanólicos de Lúpulos Cultivados na Zona da Mata Mineira.** Orientadora: Patricia Fontes Pinheiro.

A caracterização dos óleos essenciais (OEs) e extratos etanólicos (EEs) de lúpulos (*Humulus lupulus* L., variedades *Cascade*, *Comet*, *Magnum* e *Zeus*) cultivados ineditamente na Zona da Mata Mineira revelou rendimentos de OEs entre 0,05 e 0,25%, compostos majoritariamente por *E*-cariofileno (9,53–18,60%), mirceno (1,25–18,16%), alfa-humuleno (2,06–26,14%), beta-selineno (3,73–12,61%) e alfa-selineno (2,69–11,22%), com perfil químico distinto para a variedade *Zeus*. Os teores de alfa- e beta-ácidos variaram, respectivamente, de 2,54 a 9,19% e 0,60 a 2,17% nos *pellets*, e de 2,54 a 5,58% e 1,11 a 2,87% nos EEs, enquanto os compostos fenólicos variaram entre 845,98 (*Cascade*) e 1105,43 mg EAG/100 g de massa seca (*Comet*). Sem citotoxicidade em macrófagos, as amostras exibiram atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, destacando-se a variedade *Zeus* pela inibição de biofilmes bacterianos e baixas concentrações inibitórias mínimas (CIM de 31,25 $\mu\text{g/mL}$ para *S. aureus* no OE e EE, e 15,60 $\mu\text{g/mL}$ para *E. coli* no EE), e a variedade *Magnum* pelo melhor efeito sinérgico com antibióticos. Adicionalmente, os OEs e EEs apresentaram ação antiviral contra o vírus Mayaro em concentrações não tóxicas para células Vero, demonstrando o promissor potencial bioativo dos lúpulos para as indústrias farmacêutica, alimentícia e biotecnológica, além da cervejeira.

Palavras-chave: alfa-ácidos; beta-ácidos; ensaios biológicos; CLAE; CG-EM

ABSTRACT

SILVA, Mayara Stefani Ventura, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2026. **Chemical Characterization and Bioactivity Evaluation of Essential Oils and Ethanolic Extracts from Hops Cultivated in the Zona da Mata Region of Minas Gerais, Brazil.** Adviser: Patricia Fontes Pinheiro.

The characterization of the essential oils (EOs) and ethanolic extracts (EEs) of hops (*Humulus lupulus* L., *Cascade*, *Comet*, *Magnum*, and *Zeus* varieties) cultivated for the first time in the Zona da Mata Mineira region revealed EO yields between 0.05 and 0.25%, predominantly composed of *E*-caryophyllene (9.53–18.60%), myrcene (1.25–18.16%), alpha-humulene (2.06–26.14%), beta-selinene (3.73–12.61%), and alpha-selinene (2.69–11.22%), with a distinct chemical profile for the *Zeus* variety. The alpha- and beta-acid contents varied, respectively, from 2.54 to 9.19% and 0.60 to 2.17% in the *pellets*, and from 2.54 to 5.58% and 1.11 to 2.87% in the EEs, while phenolic compounds ranged from 845.98 (*Cascade*) to 1105.43 mg GAE/100 g dry weight (*Comet*). Showing no cytotoxicity in macrophages, the samples exhibited antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Staphylococcus epidermidis*. The *Zeus* variety stood out for the inhibition of bacterial biofilms and low minimum inhibitory concentrations (MIC of 31.25 μ g/mL for *S. aureus* in the EO and EE, and 15.60 μ g/mL for *E. coli* in the EE), while the *Magnum* variety stood out for the best synergistic effect with antibiotics. Additionally, the EOs and EEs presented antiviral action against the Mayaro virus at non-toxic concentrations for Vero cells, demonstrating the promising bioactive potential of hops for the pharmaceutical, food, and biotechnological industries, in addition to the brewing sector.

Keywords: alpha-acids; beta-acids; biological assays; HPLC; GC-MS

Lista de Ilustrações

Figura 1. Flor do Lúpulo.	16
Figura 2. Estrutura dos constituintes majoritários presentes nos OEs e dos α e β -ácidos presentes nos EEs de lúpulos.....	18
Figura 3. Constituintes majoritários dos OEs de lúpulos.	27
Figura 4. Biossíntese dos terpenos e sesquiterpenos.	28
Figura 5. Morfologia da Flor do Lúpulo: Brácteas, Eixo Central e Lupulina.	29
Figura 6. Reação de Isomerização dos α -ácidos durante a fervura no processo de produção de cerveja.	31
Figura 7. Rota Biossintética dos α -ácidos e β -ácidos.....	32
Figura 8. PCA e agrupamento hierárquico (clusterização) dos perfis químicos dos OEs dos lúpulos (<i>Cascade</i> , <i>Comet</i> , <i>Magnum</i> e <i>Zeus</i>).	61
Figura 9. PCA e agrupamento hierárquico (clusterização) das classes dos terpenos dos OEs dos lúpulos (<i>Cascade</i> , <i>Comet</i> , <i>Magnum</i> e <i>Zeus</i>).....	63
Figura 10. Padrão ICE-4.....	64
Figura 11. Curvas Analíticas dos constituintes do padrão ICE-4.....	64
Figura 12. PCA e agrupamento hierárquico (clusterização) dos α - e β -ácidos EEs dos lúpulos (<i>Cascade</i> , <i>Comet</i> , <i>Magnum</i> e <i>Zeus</i>).	69
Figura 13. Curva Analítica para Quantificação de Compostos Fenólicos.....	70
Figura 14. Efeito dos OEs e EEs de lúpulo (<i>Cascade</i> , <i>Comet</i> , <i>Magnum</i> e <i>Zeus</i>) na viabilidade celular da linhagem de macrófagos RAW 264.7.	74
Figura 15. Percentual de inibição da formação de biofilme da cepa <i>S. epidermidis</i> após tratamento com os OEs e EEs dos lúpulos (<i>Cascade</i> , <i>Comet</i> , <i>Magnum</i> e <i>Zeus</i>).....	76
Figura 16. Percentual de inibição da formação de biofilme da cepa <i>S. aureus</i> após tratamento com os OEs e EEs dos lúpulos (<i>Cascade</i> , <i>Comet</i> , <i>Magnum</i> e <i>Zeus</i>).....	77
Figura 17. Percentual de inibição da formação de biofilme da cepa <i>E. coli</i> após tratamento com os OEs e EEs dos lúpulos (<i>Cascade</i> , <i>Comet</i> , <i>Magnum</i> e <i>Zeus</i>).....	77
Figura 18. Σ FIC dos OEs e EEs dos lúpulos (<i>Cascade</i> , <i>Comet</i> , <i>Magnum</i> e <i>Zeus</i>).	78
Figura 19. Citotoxicidade em célula Vero dos OEs dos lúpulos (<i>Cascade</i> , <i>Comet</i> , <i>Magnum</i> e <i>Zeus</i>).	83
Figura 20. Citotoxicidade em célula Vero dos EEs dos lúpulos (<i>Cascade</i> , <i>Comet</i> , <i>Magnum</i> e <i>Zeus</i>).	84
Figura 21. Triagem Antiviral dos OEs e EEs (<i>Cascade</i> , <i>Comet</i> , <i>Magnum</i> e <i>Zeus</i>) frente ao vírus Mayaro.	86

Lista de Tabelas

Tabela 1. Alguns Estudos descritos na literatura sobre a Bioatividade dos Constituintes Químicos dos Lúpulos.	40
Tabela 2. Microrganismos utilizados no presente trabalho.	51
Tabela 3. Identificação dos constituintes voláteis dos lúpulos (<i>Cascade, Comet, Magnum e Zeus</i>).	58
Tabela 4. Porcentagens de α -ácidos nos <i>pellets</i> de lúpulos (<i>Cascade, Comet, Magnum e Zeus</i>).	66
Tabela 5. Porcentagens de β -ácidos nos <i>pellets</i> de lúpulos (<i>Cascade, Comet, Magnum e Zeus</i>).	66
Tabela 6. Porcentagens de α -ácidos nos EEs de lúpulos (<i>Cascade, Comet, Magnum e Zeus</i>).	67
Tabela 7. Porcentagens de β -ácidos nos EEs de lúpulos (<i>Cascade, Comet, Magnum e Zeus</i>).	68
Tabela 8. Concentração Inibitória Mínima, em $\mu\text{g/mL}$ dos OEs e EEs dos lúpulos (<i>Cascade, Comet, Magnum e Zeus</i>).	73
Tabela 9. Concentração citotóxica em célula Vero dos OEs e EEs dos lúpulos (<i>Cascade, Comet, Magnum e Zeus</i>).	82

Lista de Esquemas

Esquema 1. Extração dos OEs dos lúpulos (<i>Cascade, Comet, Magnum e Zeus</i>).	46
Esquema 2. Preparo dos <i>pellets</i> dos lúpulos <i>Cascade, Comet, Magnum e Zeus</i> para determinação dos α e β -ácidos.	48
Esquema 3. Preparo dos EEs dos lúpulos (<i>Cascade, Comet, Magnum e Zeus</i>).	49

Lista de Siglas/Abreviaturas

8-PN – 8-prenilnaringenina

AG – Ácido Gálico

AP-1 – Activator *Protein-1* (Proteína Ativadora 1)

ASBC – *American Society of Brewing Chemists* (Sociedade Americana de Químicos Cervejeiros)

BCAT – Aminotransferase de Aminoácidos de Cadeia Ramificada

BCKDH – Complexo Desidrogenase de α -Cetoácidos de Cadeia Ramificada

BHI – Meio de Infusão de Cérebro e Coração

bHLH – Fatores de Transcrição Hélice-Alça-Hélice-Básica

CC₂₀ – concentração citotóxica capaz de reduzir a viabilidade celular em 20%

CC₅₀ – concentração citotóxica capaz de reduzir a viabilidade celular em 50%

CG-EM – Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CP – Controle Positivo

DMAPI – Dimetil Alilpirofosfato

DMEM – Meio de Eagle Modificado por Dulbecco

DMSO – Dimetilsulfóxido

EAG – Equivalente de Ácido Gálico

EBC – *European Brewery Convention* (Convenção Europeia de Cervejarias)

EEs – Extratos Etanólicos

ERK1/2 – Quinases Reguladas por Sinais Extracelulares 1 e 2

FIC – Concentrações Inibitórias Fracionárias

FPPS – Farnesil Pirofosfato

GC-FID – Cromatografia Gasosa com Detecção por Ionização em Chama

GC x GC-MS – Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente acoplada à Espectrometria de Massas

GC x GC-FID – Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente acoplada ao Detector por Ionização em Chama

GPPS – Geranil Pirofosfato

HIHS1 — Enzima sintase de humulona 1 de *Humulus lupulus*

HIHS2 — Enzima sintase de humulona 2 de *Humulus lupulus*

HIPT1L — Enzima prenilttransferase 1 de *Humulus lupulus*
HIPT2 — Enzima prenilttransferase 2 de *Humulus lupulus*
ICE-4 — Extrato de Calibração Internacional 4
IPP – Isopentenil Pirofosfato
LC-ESI-MS/MS – Cromatografia Líquida acoplada à Ionização por Eletrospray e à Espectrometria de Massas em Tandem
LC-MS – Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas
LC-MS/MS – Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em Tandem
MAPK/ERK – Proteína Quinase Ativada por Mitógeno / Quinase Regulada por Sinais Extracelulares
MEP – Metileritritol Fosfato
MH – Monoterpeno Hidrogenado
MO – Monoterpeno Oxigenado
MOI – Multiplicidade Viral
MTT – brometo de 3-[4,5-dimetilazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólico
MYB — *Myeloblastosis* (família de fatores de transcrição MYB)
NF- κ B – *Nuclear Factor Kappa B* (Fator Nuclear Kappa B)
SFB – Soro Fetal Bovino
SH – Sesquiterpeno Hidrogenado
SO – Sesquiterpeno Oxigenado
OEs – Óleos Essenciais
PI3K/Akt – Fosfatidilinositol 3-quinase / Proteína quinase B
RMN – Ressonância Magnética Nuclear
UHPLC-MS – Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas
UHPLC-MS/MS – Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas em Tandem
UPLC-PDA – Cromatografia Líquida de Ultra Desempenho acoplada ao Detector por Arranjo de Fotodiodos
UV-Vis – Ultravioleta-Visível
VPS – Valerofenona Sintase
XN – Xanthohumol

Sumário

1	Introdução.....	16
2	Objetivos	18
2.1	<i>Objetivo Geral.....</i>	<i>18</i>
2.2	<i>Objetivos Específicos.....</i>	<i>19</i>
3	Revisão da Literatura	19
3.1	<i>Histórico do lúpulo (Humulus lupulus L.).....</i>	<i>19</i>
3.2	<i>Histórico e situação atual da produção mundial de lúpulo</i>	<i>21</i>
3.3	<i>O Lúpulo no Brasil: Histórico, Desenvolvimento e Perspectivas</i>	<i>22</i>
3.4	<i>Produção da Cerveja.....</i>	<i>24</i>
3.5	<i>Características botânicas do lúpulo (Humulus lupulus L.).....</i>	<i>25</i>
3.6	<i>Óleos essenciais do lúpulo (Humulus lupulus L.)</i>	<i>26</i>
3.7	<i>α- e β-Ácidos do lúpulo.....</i>	<i>30</i>
3.8	<i>Cromatografia aplicada à análise da composição química de lúpulos</i>	<i>34</i>
3.8.1	<i>Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) ..</i>	<i>34</i>
3.8.2	<i>Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....</i>	<i>35</i>
3.9	<i>Bioatividade.....</i>	<i>36</i>
4	Material e Método	45
4.1	<i>Material Vegetal.....</i>	<i>45</i>
4.2	<i>Óleo Essencial.....</i>	<i>45</i>
4.3	<i>Caracterização do Óleo Essencial por CG-EM.....</i>	<i>46</i>
4.4	<i>Determinação α e β-Ácidos por CLAE.....</i>	<i>47</i>
4.5	<i>Obtenção dos Extratos Etanólicos</i>	<i>49</i>
4.6	<i>Análise de Componentes Principais (PCA).....</i>	<i>49</i>
4.7	<i>Quantificação de Compostos Fenólicos</i>	<i>50</i>
4.8	<i>Atividade Antimicrobiana.....</i>	<i>51</i>
4.8.1	<i>Microrganismos e condições de cultivo</i>	<i>51</i>
4.8.2	<i>Concentração Inibitória Mínima (CIM).....</i>	<i>51</i>
4.8.3	<i>Viabilidade Celular</i>	<i>51</i>
4.8.4	<i>Teste de atividade antibiofilme dos compostos</i>	<i>52</i>
4.8.5	<i>Determinação do comportamento da combinação dos compostos com antibióticos usando ensaio checkerboard</i>	<i>53</i>
4.8.6	<i>Análise estatística.....</i>	<i>53</i>
4.9	<i>Atividade Antiviral.....</i>	<i>54</i>

5	Resultados	56
5.1	<i>Caracterização do Óleo Essencial</i>	56
5.2	<i>Determinação dos α e β-ácidos</i>	63
5.3	<i>Quantificação de Compostos Fenólicos nos EEs</i>	69
5.4	<i>Atividade Antimicrobiana.....</i>	71
5.4.1	<i>Concentração Inibitória Mínima (CIM).....</i>	71
5.4.2	<i>Viabilidade Celular</i>	74
5.4.3	<i>Teste de atividade antibiofilme dos OEs e EEs</i>	75
5.4.4	<i>Determinação do comportamento da combinação dos OEs e EEs com antibióticos usando ensaio checkerboard</i>	78
5.4.5	<i>Atividade Antiviral.....</i>	80
6	Conclusão	86
7	Referências	90
8	Apêndice.....	101

1 Introdução

O lúpulo (*Humulus lupulus* L.) é uma planta perene trepadeira pertencente à família Cannabaceae (Figura 1), amplamente cultivada em regiões de clima temperado. Tradicionalmente, suas inflorescências femininas (cones) são utilizadas na indústria cervejeira devido à presença de compostos resinosos e voláteis que conferem amargor, aroma e estabilidade microbiológica à bebida (Almaguer *et al.*, 2014). No entanto, nas últimas décadas, o lúpulo tem despertado o interesse da comunidade científica além do setor cervejeiro, especialmente por suas propriedades farmacológicas e bioativas, como atividade antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória e até antitumoral (Sun *et al.*, 2022).

Figura 1. Flor do Lúpulo.



Fonte: Própria autora

Para a indústria cervejeira, apenas as flores não fertilizadas das plantas fêmeas possuem relevância comercial, uma vez que nelas se encontram, em quantidades significativas, as glândulas de lupulina. Essas estruturas são responsáveis pela secreção da lupulina, um pó amarelo que concentra os compostos químicos de interesse tecnológico, incluindo resinas, polifenóis e óleos essenciais (OEs) (Almaguer *et al.*, 2014).

A composição fitoquímica do lúpulo é bastante complexa e variável, contendo α -ácidos (como humulona), β -ácidos (como lupulona), prenilflavonoides (como xantohumol), além de uma variedade de terpenos e sesquiterpenos, como mirceno, humuleno e cariofileno (Figura 2). Tais compostos podem ser extraídos por diferentes métodos, resultando em produtos com perfis químicos e bioatividades distintas, como os OEs e os extratos etanólicos (EEs) (Almaguer *et al.*, 2014).

Os OEs são misturas complexas de compostos voláteis, obtidos geralmente por hidrodestilação ou destilação a vapor, cuja ação antimicrobiana tem sido atribuída à capacidade de perturbar a integridade da membrana celular bacteriana, além de afetar processos respiratórios e a síntese de proteínas microbianas (Bassolé; Julien, 2012). Em contrapartida, os EEs concentram compostos de maior polaridade, como polifenóis, ácidos fenólicos e flavonoides, com reconhecida atuação no combate a microrganismos patogênicos, por meio da inibição de enzimas essenciais e da interação com estruturas celulares (Sun *et al.*, 2022).

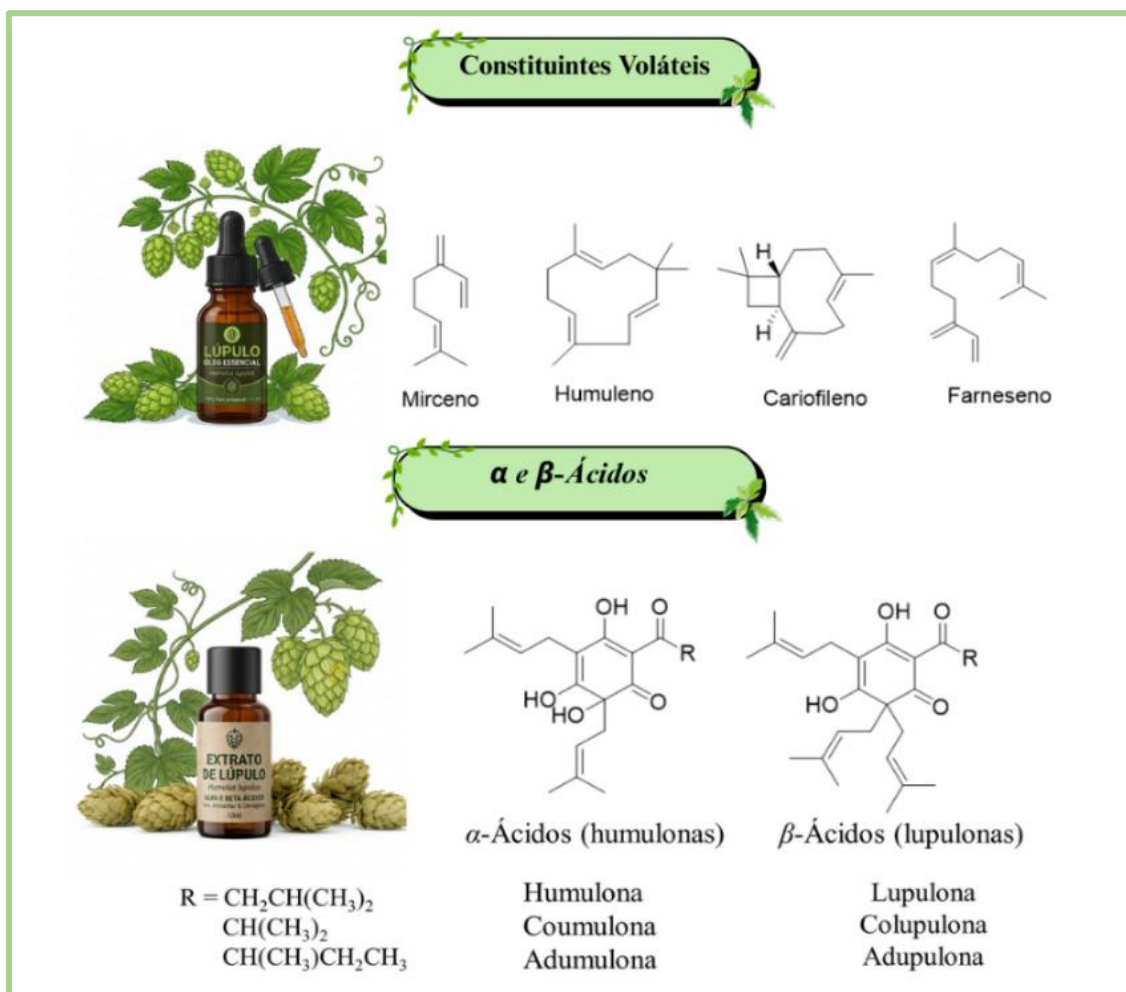
A evolução do cultivo de lúpulo (*Humulus lupulus* L.) no Brasil representa um marco recente de transição tecnológica e reestruturação produtiva na agroindústria nacional, rompendo progressivamente com o histórico de dependência quase integral das importações pelo setor cervejeiro. Tradicionalmente restrita a regiões de clima temperado devido às rígidas exigências de fotoperíodo, a cultura viabilizou-se no território brasileiro graças a pesquisas científicas focadas na "tropicalização", envolvendo adaptações de manejo e o emprego de tecnologias como a suplementação luminosa (EMBRAPA, 2023).

Nos últimos anos, o setor demonstrou um rápido amadurecimento: após um período de forte expansão inicial liderado por produtores pioneiros de pequena escala, a cadeia entrou em uma fase de consolidação. Dados do Mapa do Lúpulo Brasileiro (2024) indicam que, apesar de uma readequação que reduziu a área total cultivada para cerca de 95 hectares concentrando-se principalmente em Minas Gerais, São Paulo e Santa Catarina, a produtividade média atingiu seu recorde histórico de 852 kg por hectare. Esse expressivo ganho de eficiência agrônoma tem sido acompanhado por avanços na etapa de beneficiamento, na qual mais de 90% dos produtores já realizam a peletização do insumo dentro dos padrões internacionais de umidade, e pelo surgimento de projetos de verticalização industrial. Em conjunto, essas dinâmicas atestam a viabilidade socioeconômica da cultura no país e apontam para a sedimentação de um mercado interno mais autossuficiente e voltado à valorização do *terroir* cervejeiro nacional (Aprolúpulo, 2024).

Ineditamente, um produtor na cidade de Cajuri (14,4 Km de Viçosa), localizada na Zona da Mata Mineira, obteve êxito no cultivo das variedades *Cascade*, *Comet*, *Magnum* e *Zeus*, o que abre perspectivas para a exploração nacional de cultivares adaptadas ao clima tropical, não apenas para a produção cervejeira, mas também para aplicações biotecnológicas e farmacológicas.

Diante desse contexto, este trabalho teve como objetivo investigar a composição química e atividade antimicrobiana e antiviral dos OEs e dos EEs obtidos a partir de *pellets* de lúpulos produzidos na Zona da Mata Mineira.

Figura 2. Estrutura dos constituintes majoritários presentes nos OEs e dos α e β -ácidos presentes nos EEs de lúpulos.



Fonte: Própria autora

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar quimicamente os OEs, determinar os teores de α - e β -ácidos em *pellets* e EEs de lúpulos cultivados na Zona da Mata Mineira e avaliar suas atividades biológicas, com ênfase nos potenciais antimicrobiano e antiviral.

2.2 Objetivos Específicos

- Extrair os OEs das variedades de lúpulos *Cascade*, *Comet*, *Magnum* e *Zeus* e caracterizar por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM);
- Quantificar os teores de α - e β -ácidos nos lúpulos em *pellets* das variedades *Cascade*, *Comet*, *Magnum* e *Zeus* por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Obter EEs das variedades de lúpulos *Cascade*, *Comet*, *Magnum* e *Zeus* e quantificar os teores de α - e β -ácidos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Quantificar os compostos fenólicos presentes nos EEs das variedades de lúpulos *Cascade*, *Comet*, *Magnum* e *Zeus*;
- Avaliar o potencial antimicrobiano dos OEs e EEs de lúpulos frente as bactérias *Escherichia coli* ATCC 25922 (*E. coli*), *Staphylococcus aureus* 1013 (*S. aureus*), *Staphylococcus epidermidis* ATCC35984 (*S. epidermidis*) e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (*P. aeruginosa*);
- Avaliar o potencial antiviral dos OEs e EEs de lúpulos frente aos vírus Mayaro;
- Testar a citotoxicidade dos OEs e EEs em células VERO (linhagem de rim de macaco) e células de macrófagos RAW 264.7 (linha isolada de camundongos).

3 Revisão da Literatura

3.1 Histórico do lúpulo (*Humulus lupulus* L.)

O lúpulo é uma planta trepadeira perene pertencente à família Cannabaceae, a mesma da *Cannabis sativa*, e apresenta grande relevância histórica, econômica e tecnológica na indústria cervejeira (Korpelainen e Pietilainen, 2021). Estudos filogenéticos indicam que o gênero *Humulus* possui origem asiática, tendo se dispersado para o continente europeu através da região do Cáucaso, estabelecendo-se posteriormente em áreas de clima temperado (Korpelainen, H.; Pietilainen, 2021, Yu; Guo; Liu, 2023).

Registros históricos apontam que, na Antiguidade, o lúpulo era empregado principalmente como planta medicinal e alimentícia, sendo citado por Plínio, o Velho, que descreveu a espécie como uma erva consumida na alimentação romana (Pliny, Elder; 1945). Entretanto, sua utilização na fabricação de cerveja ocorreu somente durante a

Idade Média, existindo evidências de cultivo no século VIII na Baviera, Alemanha, e relatos do uso do lúpulo em bebidas fermentadas por volta do século XII (Hornsey, 2003; Unger, 2004).

Antes da introdução do lúpulo, as cervejas europeias eram aromatizadas com misturas de ervas conhecidas como *gruit*, compostas por espécies como mirto-do-pântano (*Myrica gale*), mil-folhas (*Achillea millefolium*) e alecrim-silvestre (*Ledum palustre*) (Behre, 1999). A substituição gradual do *gruit* pelo lúpulo ocorreu entre os séculos XIII e XV, em função das propriedades amargorantes, aromáticas e antimicrobianas proporcionadas pelos compostos fenólicos e resinas amargas presentes na planta, especialmente os α - e β -ácidos (Almaguer *et al.*, 2014; Hornsey, 2003).

Apesar das vantagens tecnológicas associadas ao lúpulo, sua adoção não ocorreu de forma imediata. Na Inglaterra, por exemplo, a produção de cervejas sem lúpulo (*ale*) persistiu até o século XVI, havendo períodos em que o ingrediente foi considerado uma “erva perniciosa”. Posteriormente, o lúpulo consolidou-se como ingrediente essencial da cerveja, sobretudo após a promulgação da Lei da Pureza da Cerveja (*Reinheitsgebot*), em 1516, na Baviera, a qual restringiu os ingredientes da cerveja à água, cevada e lúpulo (Unger, 2004; Hornsey, 2003).

A expansão do cultivo se deu inicialmente na Europa Central, com destaque para as regiões de Hallertau (Alemanha) e Saaz (República Tcheca) e, posteriormente, nos séculos XVIII e XIX, nas Américas, com a disseminação de cultivares em regiões dos Estados Unidos (Oregon e Washington). Atualmente, mais de 150 cultivares comerciais de lúpulos são conhecidas, com destaque para as linhagens amargas e aromáticas utilizadas na produção de cervejas especiais e industriais (Barthhaas, 2024).

Na era moderna, o lúpulo representa não apenas uma matéria-prima essencial para a indústria cervejeira, mas também um importante símbolo cultural e econômico associado à identidade de diferentes estilos de cerveja (Korpelainen, H.; Pietilainen, 2021). Além disso, estudos recentes têm destacado o potencial farmacológico e industrial do lúpulo devido à presença de flavonoides, terpenos e outros compostos fenólicos bioativos (Sun *et al.*, 2022; Almaguer *et al.*, 2014).

A trajetória histórica do lúpulo evidencia a intersecção entre tradição, ciência e inovação tecnológica. Desde seu emprego inicial como planta medicinal até sua consolidação como ingrediente indispensável da indústria cervejeira global, o lúpulo permanece como um recurso de elevado valor agrônomo e biotecnológico, sendo

continuamente investigado quanto à sua genética, adaptação climática e potencial funcional (Yu; Guo; Liu, 2023; Almaguer *et al.*, 2014).

3.2 *Histórico e situação atual da produção mundial de lúpulo*

O cultivo do lúpulo possui uma longa trajetória associada à evolução da cervejaria. As primeiras referências documentadas ao uso do lúpulo na produção de cerveja remontam ao século IX, na região que hoje corresponde à Alemanha, embora seu cultivo sistemático e comercial só tenha se expandido a partir do século XII, quando mosteiros e cervejeiros medievais reconheceram o potencial da planta como agente conservante e aromatizante (Barthhaas, 2024; Vadeboncoeur, 2024). A partir desse período, o lúpulo consolidou-se gradualmente como ingrediente essencial da formulação cervejeira, substituindo a *gruit*, mistura de ervas amargas utilizada tradicionalmente antes da difusão do lúpulo na Europa (Verberg, 2020).

Durante os séculos XV e XVI, o cultivo expandiu-se pela Europa Central, com destaque para as regiões de Hallertau (Alemanha), Boêmia (atual República Tcheca) e Kent (Inglaterra), que se tornaram centros tradicionais de produção (Barthhaas, 2024). O avanço técnico na secagem e prensagem das inflorescências, aliado à padronização de cultivares com teores elevados de α -ácidos, consolidou o comércio internacional de lúpulo entre os séculos XVIII e XIX, coincidindo com a expansão global da indústria cervejeira (FAO, 2023).

No século XX, o cultivo de lúpulo ganhou importância econômica em novas regiões, especialmente nos Estados Unidos, que iniciaram a produção em larga escala no Noroeste do país, nos estados de Washington, Oregon e Idaho. Esses locais reúnem condições climáticas ideais para o cultivo: verões amenos, longos dias de luz e baixa umidade no período de colheita. Nas décadas de 1970 e 1980, o desenvolvimento de cultivares com alto teor de α -ácidos e maior resistência a doenças consolidou a posição norte-americana no mercado global (Almaguer *et al.*, 2014).

Atualmente, a produção mundial de lúpulo encontra-se concentrada em um número reduzido de países. De acordo com o relatório da Barthhaas (2024–2025), a produção global atingiu aproximadamente 113,5 mil toneladas, distribuídas em cerca de 59 mil hectares cultivados. Alemanha e Estados Unidos permanecem como os principais produtores mundiais, sendo responsáveis conjuntamente por aproximadamente 80% da produção global. Outros países com participação relevante incluem República Tcheca, Polônia, Eslovênia, China, Reino Unido, Austrália e Nova Zelândia (Barthhaas, 2024).

Nos últimos anos, a expansão do mercado de cervejas especiais influenciou o aumento da diversidade varietal e da demanda por lúpulos aromáticos, caracterizados por teores mais elevados de OEs e compostos voláteis de impacto sensorial. Essa tendência impulsionou investimentos em melhoramento genético e desenvolvimento de cultivares regionais adaptadas a diferentes condições (Almaguer *et al.*, 2014). Entretanto, a desaceleração no consumo global de cerveja convencional e a superprodução observada a partir de 2023 levaram a uma redução das áreas plantadas, especialmente nos Estados Unidos, para reequilibrar o mercado) (Barthhaas, 2024).

A produtividade média mundial varia entre 1.500 e 2.000 kg ha⁻¹, dependendo das condições edafoclimáticas e do nível tecnológico empregado. Regiões com clima temperado e fotoperíodo longo tendem a apresentar rendimentos mais altos, enquanto áreas tropicais ainda enfrentam desafios de adaptação da cultura (FAO, 2023). Nos últimos anos, países como Brasil, Chile e Argentina têm realizado experimentos de cultivo, buscando reduzir a dependência de importações e criar cadeias produtivas locais (Santos *et al.*, 2022).

Portanto, a história do lúpulo reflete uma combinação entre tradição e inovação. Desde o cultivo monástico medieval até os modernos sistemas de produção mecanizada e rastreada por sensoriamento remoto, o lúpulo mantém papel central na indústria cervejeira e se consolida como uma cultura de valor agregado, estratégica tanto para economias consolidadas quanto para novos produtores em expansão (Santos *et al.*, 2022; Almaguer *et al.*, 2014).

3.3 O Lúpulo no Brasil: Histórico, Desenvolvimento e Perspectivas

O lúpulo é uma planta trepadeira perene da família Cannabaceae, utilizada tradicionalmente na produção de cervejas pela presença de resinas amargas (α - e β -ácidos) e OEs responsáveis pelo sabor, aroma e estabilidade microbiológica da bebida (Marques *et al.*, 2024). O cultivo da espécie é historicamente concentrado em regiões de clima temperado do hemisfério norte, como Alemanha, Estados Unidos e República Tcheca, devido à necessidade de fotoperíodo longo e temperaturas amenas para o adequado desenvolvimento vegetativo e indução floral (Almaguer *et al.*, 2014).

No Brasil, as primeiras menções ao cultivo de lúpulo remontam ao século XIX, quando há registros de importação de mudas por Dom Pedro II em 1885, com tentativas experimentais de cultivo em regiões do Sul e Sudeste (AEN, 2024). No início do século XX, há relatos de pequenas plantações no estado do Paraná, especialmente em

Guarapuava, a partir de mudas trazidas dos Estados Unidos por cervejeiros locais (AEN, 2024). Contudo, tais iniciativas não prosperaram devido às condições climáticas desfavoráveis e à ausência de conhecimento técnico sobre o manejo da cultura (Limberger; Cunha, 2025).

Até a década de 2010, o país manteve dependência quase total da importação de lúpulo para suprimento da indústria cervejeira, que se expandiu significativamente após o surgimento do movimento de cervejas especiais (Guimarães; Evaristo; Ghesti, 2021). Em 2020, o Brasil importou cerca de 3.243 toneladas de lúpulo, movimentando aproximadamente US\$ 57 milhões (MAPA, 2022). Essa dependência impulsionou o interesse de pesquisadores, empreendedores e instituições públicas pela nacionalização da produção.

A partir de 2015, observa-se um marco na “tropicalização” do lúpulo, isto é, o processo de adaptação agrônômica da espécie às condições climáticas brasileiras (EMBRAPA, 2023). Iniciativas coordenadas por instituições como a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), universidades estaduais e a Associação Brasileira de Produtores de Lúpulo (Aprolúpulo) resultaram na introdução de cultivares adaptadas e em técnicas inovadoras, como o uso de iluminação artificial suplementar, manejo de duas safras por ano e controle da dormência artificial (EMBRAPA, 2023)

Estudos conduzidos em regiões subtropicais, como o Paraná e Santa Catarina, demonstraram que o lúpulo pode ser cultivado com produtividade economicamente viável sob manejo intensivo e irrigação (Araldi *et al.*, 2024). Pesquisas mostram que, embora a produtividade média brasileira ainda seja inferior à dos países como Estado Unidos e Alemanha, os teores de α -ácidos e de OEs podem atingir padrões compatíveis com o mercado cervejeiro (Almeida; Conto, 2024).

Do ponto de vista econômico, o cultivo de lúpulo apresenta potencial de diversificação agrícola e agregação de valor para pequenos produtores rurais, especialmente no Sul e Sudeste do país. Um estudo de caso na região do Arenito Caiuá, no Paraná, revelou que o investimento inicial é alto, devido à necessidade de estrutura de sustentação, irrigação e secagem, porém a rentabilidade pode ser atrativa com o uso de cultivares adaptadas e boas práticas pós-colheita. Estimativas apontam que o número de produtores cresceu de apenas um em 2015 para mais de 100 em 2023, com área cultivada superior a 110 hectares e produção anual de cerca de 88 toneladas (Aprolúpulo, 2023).

A consolidação da cadeia produtiva do lúpulo no Brasil depende, contudo, de avanços em três frentes principais: (i) desenvolvimento genético de cultivares adaptadas ao fotoperíodo tropical, (ii) estruturação de unidades de beneficiamento e secagem, e (iii) articulação entre produtores, universidades e cervejarias para assegurar a qualidade e rastreabilidade do produto (MAPA, 2022; EMBRAPA, 2023). Nesse contexto, o lançamento do livro *Lúpulo no Brasil: Perspectivas e Realidades* pelo Ministério da Agricultura e o Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura (IICA) representa um marco institucional na consolidação da cultura como alternativa econômica emergente (MAPA, 2022).

Do ponto de vista social e ambiental, a introdução do lúpulo em pequenas propriedades rurais tem favorecido a inclusão de jovens e mulheres, contribuindo para a diversificação de renda e a sustentabilidade das comunidades locais (EMBRAPA, 2023). Ademais, a expansão da produção nacional poderá reduzir a dependência externa e fortalecer a cadeia de insumos da indústria cervejeira, que hoje é uma das que mais crescem no agronegócio brasileiro (EMBRAPA, 2023).

O lúpulo emerge como uma cultura em ascensão no Brasil, cuja consolidação exige o avanço simultâneo em pesquisa, infraestrutura e políticas públicas. Embora o país ainda enfrente limitações climáticas e estruturais, os resultados recentes indicam viabilidade técnica e econômica promissora (MAPA, 2022; EMBRAPA, 2023; Araldi *et al.*, 2024). Dessa forma, o estudo e o desenvolvimento do lúpulo em território nacional se apresentam não apenas como uma oportunidade de inovação agrícola, mas também como um vetor de fortalecimento da agroindústria cervejeira e de promoção do desenvolvimento regional sustentável (MAPA, 2022; EMBRAPA, 2023; Araldi *et al.*, 2024).

3.4 Produção da Cerveja

A produção de cerveja une processos bioquímicos rigorosos e criatividade, transformando ingredientes básicos em uma bebida de alta complexidade. De modo geral, a fabricação segue um fluxo sequencial e bem definido, essencial para garantir a estabilidade e a qualidade do produto final (Bamforth, 2011).

O processo se inicia com a mosturação ou brassagem, etapa em que os grãos de malte moídos são misturados com água quente. Esse aquecimento ativa enzimas que convertem os amidos dos grãos em açúcares fermentáveis, resultando em um líquido doce chamado mosto. Em seguida, o mosto é transferido para a fervura, cujo papel é esterilizar

o líquido, inativar as enzimas e concentrar sabores. Após a fervura, o mosto é resfriado e segue para a fermentação, momento em que as leveduras são inoculadas. Estes micro-organismos consomem os açúcares, transformando-os em álcool e gás carbônico. Por fim, a bebida passa pela maturação etapa de descanso a frio para o arredondamento de sabores e clarificação antes de seguir para o envase, ficando pronta para o consumo (Palmer, 2017). É especificamente na etapa de fervura que o lúpulo ganha protagonismo, e o exato momento de sua adição define se a cerveja terá um perfil voltado para o amargor ou para o aroma (Hieronymus, 2012).

Nas cervejas de amargor, o lúpulo é inserido logo no início da fervura. A exposição prolongada ao calor intenso (geralmente de 60 a 90 minutos) provoca uma reação química chamada isomerização dos α -ácidos. É essa reação que extrai o amargor necessário para equilibrar a doçura proveniente do malte. Contudo, esse calor constante destrói e evapora os delicados OEs da planta. Por outro lado, na produção de cervejas aromáticas, os cervejeiros adicionam o lúpulo apenas nos minutos finais da fervura ou logo após o desligamento do fogo. Com a drástica redução do tempo de contato com as altas temperaturas, a isomerização é mínima gerando pouco ou nenhum amargor, o que permite a preservação dos OEs voláteis que conferem notas cítricas, florais, resinosas ou frutadas à bebida (Hieronymus, 2012).

Para levar esse perfil aromático a um nível máximo, sem acrescentar adstringência ou amargor, a indústria e os cervejeiros utilizam a técnica de *dry hopping*. Esta prática consiste na adição de lúpulo a frio, diretamente nos tanques de cerveja, durante ou após a etapa de fermentação (Janish, 2019). Como a temperatura do líquido é baixa e não há calor envolvido, é impossível que ocorra a isomerização dos alfa-ácidos, garantindo que o amargor permaneça inalterado. A cerveja age como um solvente frio, extraindo apenas os compostos aromáticos mais puros do lúpulo. Historicamente associado ao estilo *India Pale Ale* (IPA) e amplamente utilizado em suas variações modernas, o *dry hopping* é o grande responsável por aquela "explosão" de aromas frescos que saltam do copo antes mesmo do primeiro gole (Steele, 2012).

3.5 Características botânicas do lúpulo (*Humulus lupulus* L.)

O *H. lupulus* L. é uma cultura de grande importância econômica, amplamente cultivada nas regiões temperadas do mundo. Trata-se de uma espécie dioica, composta por plantas masculinas e femininas. As inflorescências femininas, conhecidas como “cones de lúpulo” ou simplesmente “lúpulo”, são as únicas capazes de produzir, por meio

das glândulas de lupulina, um pó resinoso de coloração amarelada onde se concentram os OEs e os α e β -ácidos, sintetizados pelos tricomas glandulares presentes nos estróbilos. Esses compostos são responsáveis por conferir à cerveja características fundamentais de sabor e aroma, além de atuarem como conservantes naturais e agentes estabilizantes de espuma (Almaguer *et al.*, 2014; Ocvirk; Grdadolnik; Kosir, 2016).

O epíteto *lupulus* deriva do latim *lúpus* (“lobo”), em alusão ao hábito trepador da planta, que parece “subir” sobre outras espécies, de forma semelhante a um lobo sobre sua presa. A origem do nome *Humulus* permanece incerta, embora haja a hipótese de que esteja relacionada a *húmus*, referência aos solos férteis em que a espécie cresce e é cultivada (Zanoli; Zavatti, 2008).

Nos sistemas de cultivo, as plantas masculinas são removidas manualmente para evitar a polinização das plantas femininas e, conseqüentemente, a formação de sementes, consideradas indesejáveis pela maioria dos cervejeiros. Acredita-se que a oxidação dos ácidos graxos presentes nas sementes gere sabores indesejáveis na cerveja. Além disso, plantas não fecundadas tendem a apresentar maiores concentrações de OEs e resinas (α e β -ácidos). Contudo, indivíduos masculinos são indispensáveis nos programas de melhoramento genético, permitindo a obtenção de novas variedades por meio de cruzamentos dirigidos (Almaguer *et al.*, 2014).

Cerca de 97% do lúpulo mundial cultivado é destinado para fins de cerveja, onde a produção mundial é dominada pela Alemanha e EUA. O cultivo da planta requer condições ideais, especialmente com relação à duração da luz do dia, temperatura durante o verão, precipitação anual e fertilidade do solo. A planta é cultivada em regiões temperadas de clima mais moderados (Almaguer *et al.*, 2014).

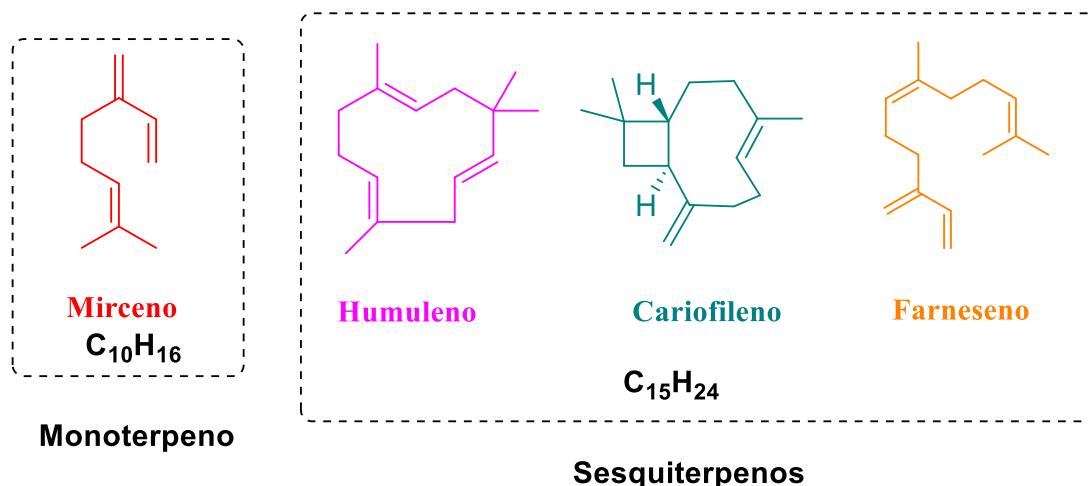
3.6 Óleos essenciais do lúpulo (*Humulus lupulus* L.)

O lúpulo é uma planta perene da família Cannabaceae amplamente utilizada na indústria cervejeira devido à presença de compostos aromáticos e resinosos em suas flores femininas, denominadas cones. Entre esses compostos, destacam-se os OEs, responsáveis pelo aroma característico e por diversas propriedades biológicas de interesse industrial e farmacológico (Almaguer *et al.*, 2014).

Os OEs do lúpulo consistem em uma mistura complexa de hidrocarbonetos terpênicos voláteis, principalmente monoterpenos (C_{10}) e sesquiterpenos (C_{15}), sendo os principais componentes o β -mirceno, α -humuleno, β -cariofileno e o (*E*)- β -farnaseno (Figura 3). Esses compostos conferem notas aromáticas que variam entre floral, cítrica,

resinosa e terrosa, influenciando o perfil sensorial das cervejas especiais e industriais (Rettberg; Biendl; Garbe, 2018; Farag *et al.*, 2012).

Figura 3. Constituintes majoritários dos OEs de lúpulos.



Fonte: Própria autora.

O mirceno é o principal monoterpene volátil do lúpulo, presente na maioria das variedades em concentrações de 3 a 10 mg × g⁻¹ de matéria seca e caracterizado por aroma resinoso, herbal e de pinho. Embora contribua significativamente para o aroma do lúpulo, degrada-se rapidamente durante o armazenamento aeróbio e no processo de fabricação da cerveja, originando diversos compostos oxidativos, como pinenos, canfeno, *p*-cimeno e terpenoides (linalol, geraniol, citral, entre outros (Almaguer *et al.*, 2014).

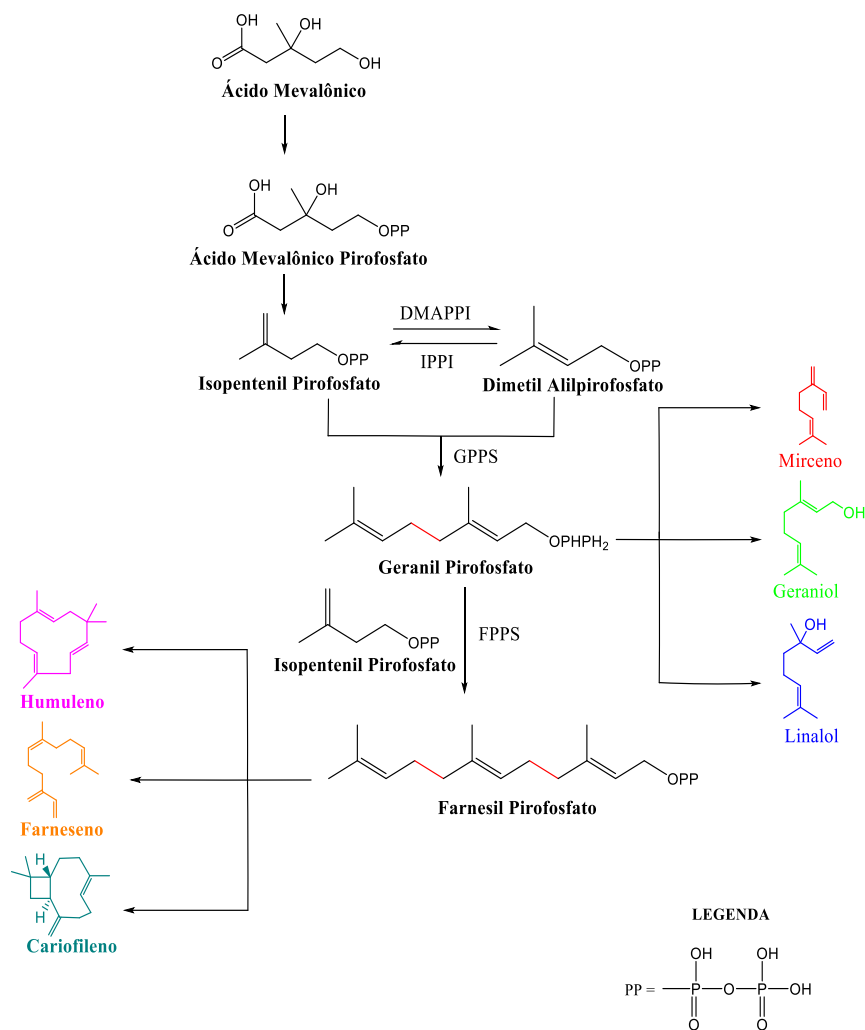
Entre os sesquiterpenos, destacam-se α -humuleno, β -cariofileno e β -farneseno, sendo o α -humuleno o mais abundante. Em cromatogramas típicos de óleo de lúpulo, o β -mirceno aparece como o primeiro grande pico, seguido por β -cariofileno e α -humuleno. O β -farneseno ocorre apenas em algumas variedades e geralmente em baixas concentrações. O lúpulo também contém diversos hidrocarbonetos terpênicos bicíclicos e tricíclicos, além de terpenoides com diferentes grupos funcionais (Almaguer *et al.*, 2014).

A composição dos OEs depende fortemente de fatores genéticos e ambientais, como a variedade do lúpulo, o clima, a fertilidade do solo, o estágio de maturação e as condições de armazenamento pós-colheita (Rettberg; Biendl; Garbe, 2018). Os principais constituintes dos OEs de lúpulo identificados por CG-EM, conforme descrito na

literatura, incluem β -mirceno (0,3–60%), α -humuleno (2,3–51,2%), β -cariofileno (0,1–14,7%) e (*E*)- β -farneseno (1,3–9,5%) (Durello *et al.*, 2019).

A biossíntese de terpenos pela rota do ácido mevalônico inicia-se com a condensação de três moléculas de acetil-CoA, as quais participam de uma sequência de reações enzimáticas que culminam, após etapas de pirofosforilação, descarboxilação e desidratação, na formação do isopentenil pirofosfato (IPP), unidade de cinco carbonos (C5) considerada o precursor básico dos terpenos. Paralelamente, a síntese do isômero do IPP ocorre pela rota do metileritritol fosfato, resultando na produção do dimetil alilpirofosfato (DMAPPI, C5). A condensação entre IPP e DMAPPI leva à formação do geranyl pirofosfato (GPPS), composto precursor dos monoterpenos (C10). A adição de uma nova unidade de IPP ao GPPS origina o farnesil pirofosfato (FPPS, C15), precursor dos sesquiterpenos e triterpenos Figura 4 (Taiz; Zeiger, 2009).

Figura 4. Biossíntese dos terpenos e sesquiterpenos.

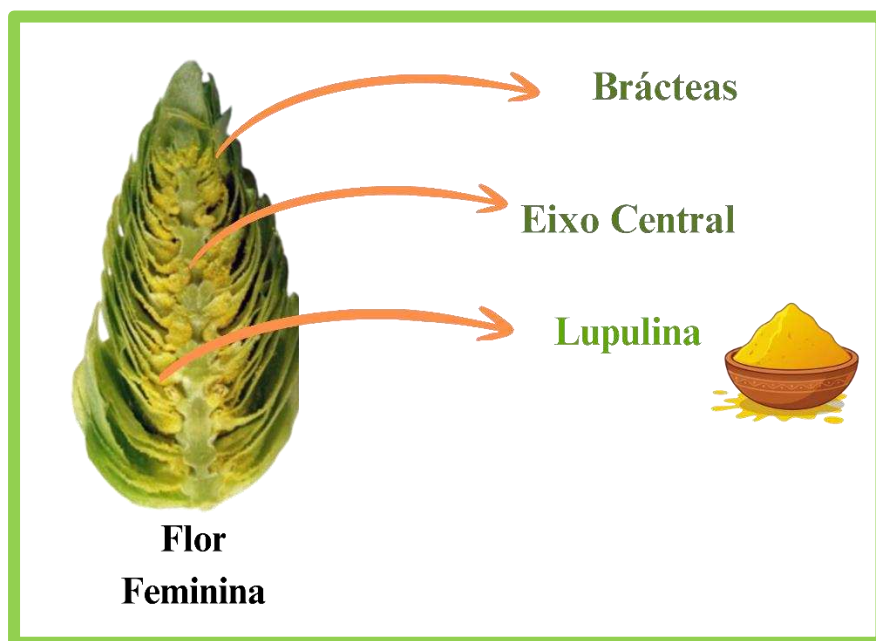


Fonte: Durello *et al.*, 2019 adaptado.

Além de seu papel fundamental na cervejaria, os hidrocarbonetos terpênicos e terpenoides presentes no lúpulo desempenham múltiplas funções na fisiologia da planta. Esses compostos são sintetizados e emitidos principalmente pelas glândulas de lupulina (tricomas glandulares) (Figura 5) dos cones de lúpulo, atuando como importantes mecanismos de defesa contra herbívoros e patógenos, bem como na atração de polinizadores e dispersores de sementes. Do ponto de vista biológico, os OEs exercem funções protetoras semelhantes, além de contribuírem para interações ecológicas essenciais. Em aplicações industriais e farmacológicas, diversos estudos têm demonstrado que esses terpenos apresentam atividades antimicrobianas, antioxidantes e anti-inflamatórias, reforçando seu potencial para utilização em produtos cosméticos e fitoterápicos (Rettberg; Biendl; Garbe, 2018).

No interior dos cones da planta de lúpulo feminino, também são encontradas substâncias denominadas α - e β -ácidos, que são ácidos fenólicos alicíclicos resinosos, também chamados de ácidos amargos do lúpulo. As principais estruturas desses α -ácidos (humulona, cohumulona e adhumulona) e β -ácidos correspondentes (lupulona, colupulona e adlupulona) foram apresentadas na Figura 2 (Farag *et al.*, 2012).

Figura 5. Morfologia da Flor do Lúpulo: Brácteas, Eixo Central e Lupulina.



Fonte: Própria autora

3.7 α - e β -Ácidos do lúpulo

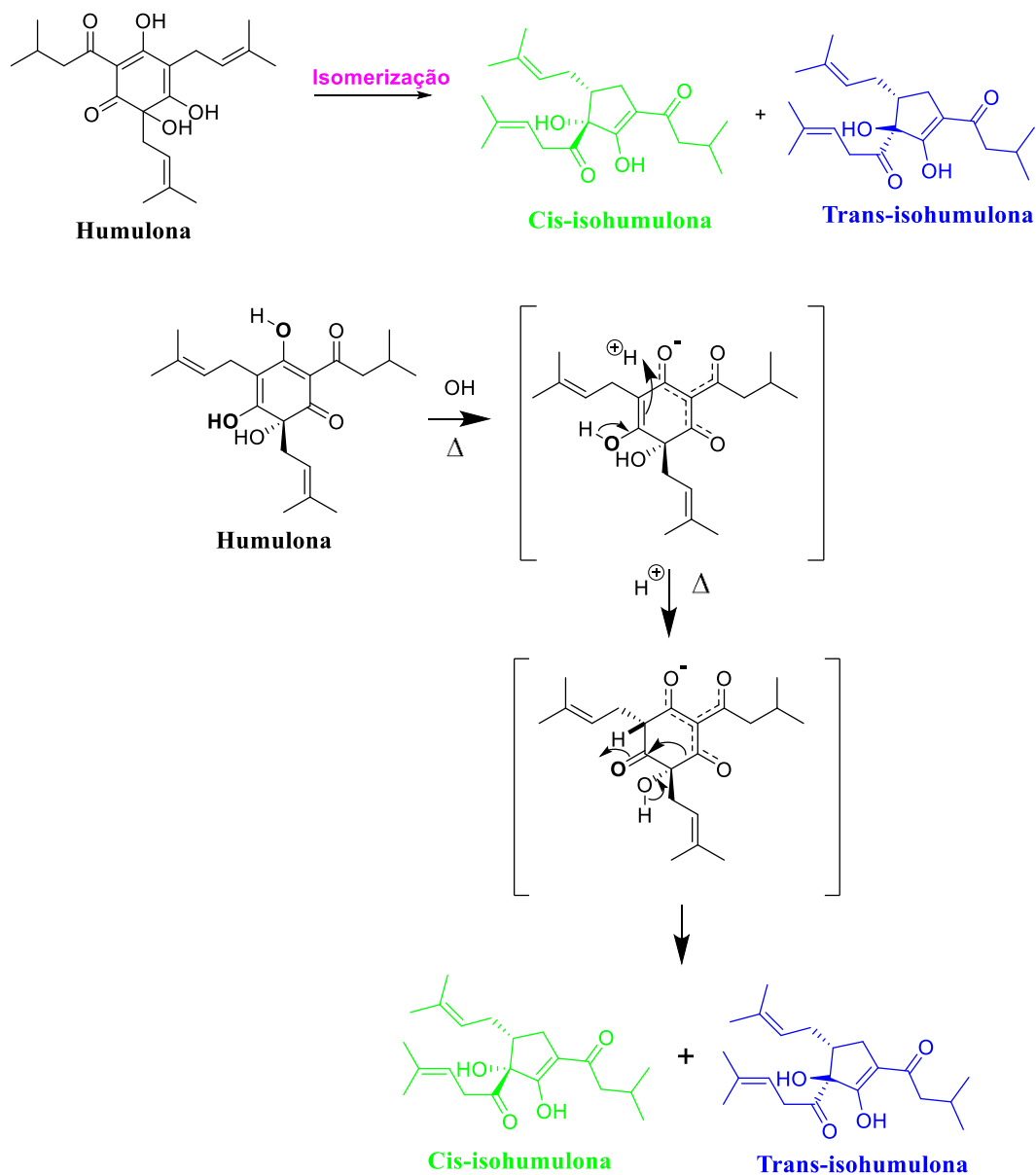
Além dos OEs, as flores femininas do lúpulo contêm uma fração resinosa rica em ácidos amargos, divididos em duas classes principais: os α -ácidos (humulonas) e os β -ácidos (lupulonas). Esses compostos se acumulam nas glândulas de lupulina, pequenas estruturas secretoras localizadas nos cones femininos da planta (Almaguer *et al.*, 2014).

Os α -ácidos são precursores de compostos que conferem amargor e que equilibram a doçura da cevada maltada e os β -ácidos contribuem significativamente menos para amarguras gerais (Baker *et al.*, 2008). Durante o processo de fervura do mosto, os α -ácidos são termicamente isomerizados em iso- α -ácidos, formas mais solúveis que conferem o sabor amargo típico das cervejas. Já os β -ácidos, como lupulona, colupulona e adlupulona, possuem menor contribuição sensorial, mas apresentam relevante atividade antimicrobiana e antioxidante, sendo utilizados como agentes naturais de conservação (Almaguer *et al.*, 2014).

Os β -ácidos, por não possuírem um grupo alcoólico terciário no núcleo aromático, não sofrem isomerização e apresentam caráter altamente hidrofóbico devido à presença de uma segunda cadeia isoprenílica (Olsovska, 2016). Como consequência, são pouco solúveis em água e tendem a ser perdidos durante a fervura e fermentação do mosto. Embora contribuam mais para o aroma da cerveja do que para o amargor, são compostos facilmente oxidáveis e, quando expostos à luz, podem gerar sabores indesejáveis (Faraç *et al.*, 2012; Almaguer *et al.*, 2014).

Os α -ácidos apesar de também serem insolúveis em água, tornam-se solúveis após sofrerem isomerização durante a fervura, e quanto maior o tempo de fervura, maior será o amargor produzido (Figura 6) (Danenhowe *et al.*, 2008). A humulona, ao isomerizar, origina duas isohumulonas epiméricas (cis e trans), sendo a forma cis mais amarga. Além disso, as isohumulonas apresentam amargor superior ao das isocohumulonas (Almaguer *et al.*, 2014).

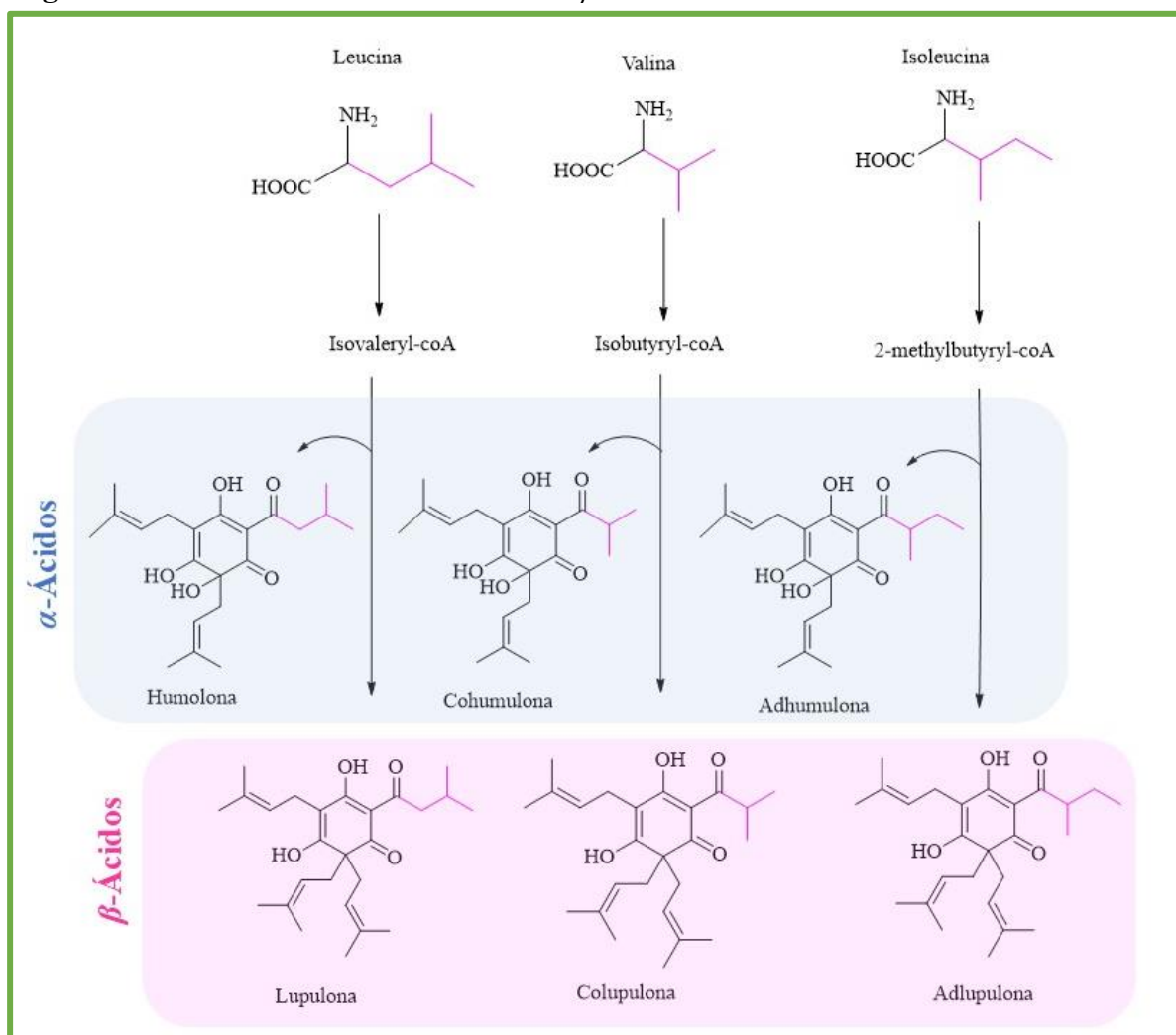
Figura 6. Reação de Isomerização dos α -ácidos durante a fervura no processo de produção de cerveja.



Fonte: Durello *et al.*, 2019 adaptado.

A biossíntese dos ácidos amargos no lúpulo (Figura 7) depende principalmente de três precursores: os tioésteres acil-CoA de cadeia ramificada, utilizados como iniciadores da síntese de policetídeos; o malonil-CoA, que atua como extensor; e o dimetilalil difosfato (DMAPP), responsável pela doação de grupos prenila. Os acil-CoAs isovaleril-CoA, isobutiril-CoA e 2-metilbutiril-CoA são derivados da degradação dos aminoácidos de cadeia ramificada leucina, valina e isoleucina. A biossíntese desses aminoácidos ocorre nos plastídios, enquanto sua degradação ocorre nas mitocôndrias, envolvendo enzimas Aminotransferase de Aminoácidos de Cadeia Ramificada (BCAT) e o Complexo Desidrogenase de α -Cetoácidos de Cadeia Ramificada (BCKDH). O DMAPP necessário para a prenilação dos ácidos amargos é fornecido pela via do metileritritol fosfato (MEP), localizada nos plastídios, que também participa da formação de mono e sesquiterpenos presentes nas glândulas de lupulina (Clark *et al.*, 2013).

Figura 7. Rota Biossintética dos α -ácidos e β -ácidos.



As etapas finais da biossíntese dos ácidos amargos são exclusivas do lúpulo. A enzima valerofenona sintase (VPS), pertencente à classe das policetídeo sintases tipo III, condensa um acil-CoA derivado de aminoácidos de cadeia ramificada com três moléculas de malonil-CoA, formando o núcleo policetídeo. Em seguida, enzimas preniltransferases realizam prenilações que originam intermediários diprenilados. A partir desse ponto, as vias dos α - e β -ácidos se diferenciam: os β -ácidos recebem uma terceira prenilação, enquanto os α -ácidos são formados por uma reação de oxidação catalisada por uma enzima ainda não identificada (Clark *et al.*, 2013).

Os α e β -ácidos representam importantes metabólitos secundários do lúpulo, cujas rotas biossintéticas envolvem a interação entre o metabolismo dos poliquetídeos e dos terpenoides. O estudo detalhado dessas vias, de suas enzimas e da regulação gênica associada fornece subsídios valiosos para o melhoramento genético, o aperfeiçoamento

agronômico e o desenvolvimento biotecnológico de compostos bioativos derivados do lúpulo (Clark *et al.*, 2013).

3.8 *Cromatografia aplicada à análise da composição química de lúpulos*

A análise química detalhada dos compostos presentes nos cones de lúpulo (*Humulus lupulus* L.) é essencial para compreender suas propriedades sensoriais, tecnológicas e farmacológicas. Dentre as metodologias empregadas, as técnicas cromatográficas, especialmente a cromatografia gasosa (CG) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), representam ferramentas fundamentais na identificação e quantificação dos constituintes voláteis e não voláteis do lúpulo (Pinheiro *et al.*, 2015; Arruda *et al.*, 2021).

3.8.1 *Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)*

Os OEs do lúpulo são constituídos predominantemente por monoterpenos e sesquiterpenos, sendo os principais compostos β -mirceno, α -humuleno, *E*-cariofileno e β -farneseno (Zanoli, Zavatti; 2008). Esses metabólitos voláteis desempenham papel fundamental na definição do aroma e flavor cervejeiro. A caracterização desses compostos é geralmente realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), técnica considerada altamente eficiente para identificação e quantificação de substâncias voláteis em matrizes vegetais complexas (Ligor *et al.*, 2013).

A aplicação de CG-EM em estudos envolvendo lúpulo permite não apenas a identificação qualitativa dos compostos terpênicos, mas também a diferenciação entre cultivares e regiões de cultivo. Mais de 170 a 200 compostos podem ser separados e suas quantidades estimadas em uma única análise por cromatografia gasosa capilar (CG-EM) de OEs de lúpulo, uma ferramenta muito adequada para estudos comparativos de diferentes plantas por meio de perfis cromatográficos. A alta resolução e a capacidade de fornecer dados qualitativos e quantitativos precisos e acurados distinguem a análise por CG-EM como uma ferramenta valiosa para estudos taxonômicos de plantas (Ligor *et al.*, 2013).

Compostos voláteis presentes nos OEs podem sofrer degradação oxidativa ao longo do tempo, resultando em alterações sensoriais que impactam diretamente a qualidade cervejeira. Nesse contexto, a CG-EM possibilita monitorar modificações no perfil químico do lúpulo e identificar produtos derivados da oxidação de terpenos, contribuindo para o controle de qualidade da matéria-prima (Ligor *et al.*, 2013).

Com o avanço das metodologias cromatográficas e espectrométricas, a CG-EM passou a apresentar maior precisão e sensibilidade na identificação de compostos presentes em baixas concentrações. A utilização de bibliotecas espectrais e técnicas cromatográficas multidimensionais ampliou significativamente o potencial analítico da metodologia, permitindo estudos mais detalhados sobre a composição química dos OEs do lúpulo e suas aplicações tecnológicas, farmacológicas e sensoriais (Pinheiro *et al.*, 2015).

3.8.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Os compostos não voláteis presentes nos cones de lúpulo, principalmente os α -ácidos (humulonas) e β -ácidos (lupulonas), são tradicionalmente analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), método considerado padrão pela European Brewery Convention (EBC) e pela American Society of Brewing Chemists (ASBC) (ASBC, 2021).

Além dos compostos voláteis, o lúpulo apresenta elevada concentração de compostos fenólicos, flavonoides prenilados e chalconas, entre eles a xanthohumol, substância amplamente investigada por suas propriedades antioxidantes e farmacológicas. A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas é frequentemente empregada para a caracterização desses compostos não voláteis, permitindo elevada sensibilidade analítica e precisão na determinação estrutural (Önder; Ay; Sarker, 2013).

A aplicação da CLAE associada a detectores UV-Vis e espectrometria de massas (LC-MS/MS) ampliou significativamente o potencial analítico para estudos químicos do lúpulo. Önder, Ay e Sarker (2013) utilizaram LC-MS/MS para quantificar compostos fenólicos e flavonoides presentes em extratos de *Humulus lupulus* L., identificando substâncias bioativas importantes, incluindo xanthohumol e derivados prenilados. Os autores observaram elevada atividade antioxidante nos extratos analisados, correlacionando os resultados com o conteúdo fenólico total determinado por CLAE (Önder; Ay; Sarker, 2013).

Além da análise de compostos fenólicos, a CLAE também é amplamente empregada na avaliação da qualidade tecnológica do lúpulo destinado à produção cervejeira. Os α -ácidos presentes nas glândulas de lupulina são responsáveis pelo amargor característico da cerveja, enquanto os β -ácidos contribuem para propriedades sensoriais e antimicrobianas. Nesse contexto, a determinação quantitativa desses compostos por

CLAE representa uma importante ferramenta para controle de qualidade da matéria-prima cervejeira (Arruda *et al.*, 2021).

Estudos recentes demonstram ainda a utilização da CLAE em análises metabolômicas e autenticação varietal de lúpulo. Almeida *et al.* (2020), ao avaliarem extratos de lúpulo *Cascade* cultivado no Brasil por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem com ionização por eletrospray (LC-ESI-MS/MS), verificaram diferenças significativas na composição química quando comparadas a cultivares produzidas em regiões tradicionais de cultivo. Os autores atribuíram essas diferenças às condições edafoclimáticas brasileiras, ressaltando a influência do ambiente sobre o metabolismo secundário da planta (Almeida *et al.*, 2020).

A associação da CLAE com espectrometria de massas permitiu avanços importantes na identificação estrutural de compostos presentes em baixas concentrações no lúpulo. Técnicas como Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em Tandem (LC-MS/MS) e cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (UHPLC-MS) apresentam elevada seletividade e sensibilidade, possibilitando a caracterização detalhada de flavonoides prenilados, ácidos fenólicos e outros metabólitos bioativos. Essas metodologias têm sido amplamente utilizadas em pesquisas envolvendo atividade biológica, estabilidade oxidativa e aplicações farmacológicas do lúpulo (Carbone; Gervasi, 2022).

3.9 Bioatividade

O lúpulo é utilizado desde o antigo Egito como conservante de alimentos e bebidas, especialmente cerveja, devido às suas propriedades antimicrobianas (Koetter, 2010). Os ácidos amargos presentes na planta apresentam atividade inibitória principalmente contra bactérias Gram-positivas, como *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus* e *Bacillus*, além de fungos dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* (Bocquet; Sahpaz; Revière, 2018; Macchioni, *et al.*, 2021). Também foram relatadas atividades contra bactérias Gram-negativas, incluindo *Helicobacter pylori* e espécies de *Brucella* (Abiko; Paudel; Uehara, 2022; Macchioni *et al.*, 2021). Entre os ácidos amargos, a lupulona apresenta maior atividade antimicrobiana que a humulona, enquanto a isohumulona demonstra menor eficácia (Cermak *et al.*, 2017). Os mecanismos de ação envolvem principalmente alterações na membrana bacteriana, associadas ao efeito ionóforo de prótons e ao estresse oxidativo (Schmalreck; Teuber, 1975; Behr; Vogel, 2010).

Os iso- α e β -ácidos demonstraram atividade inibitória contra *Pediococcus pentosaceus* em diferentes condições de pH, sugerindo potencial aplicação do lúpulo no controle de contaminações em bebidas fermentadas (Michiu *et al.*, 2019). Outros compostos, como o xanthohumol (XN), apresentaram elevada atividade antimicrobiana frente a bactérias anaeróbias humanas, incluindo: *Bacteroides fragilis*, *Clostridium perfringens* e *Clostridium difficile* (Cermak *et al.*, 2017). Estudos também relataram efeitos sinérgicos entre humulona, lupulona e XN quando combinados a antibióticos, inclusive contra bactérias Gram-negativas (Fahle; Bereswill; Heimesaat, 2022).

Extratos de lúpulo apresentaram atividade antimicobacteriana contra cepas sensíveis e resistentes de *Mycobacterium tuberculosis*, com valores de concentração inibitória mínima variando entre 400 e 800 $\mu\text{g/mL}$ (Serkani *et al.*, 2012). Além disso, extratos de diferentes cultivares demonstraram ação contra *Mycobacterium bovis* BCG (Bacilo de Calmette-Guérin), destacando-se a variedade *Citra* (Blaxland; Thomas; Baillie, 2022). Extratos hidroalcoólicos de lúpulo também apresentaram forte ação antibacteriana e antibiofilme contra *Cutibacterium acnes* e cepas multirresistentes de estafilococos (Di Lodovico *et al.*, 2020; Weber *et al.*, 2019).

Atividades antifúngicas também foram descritas para extratos e compostos do lúpulo contra espécies de *Candida*, *Fusarium*, *Trichophyton*, *Rhizoctonia*, *Botrytis* e *Magnaporthe* (Abiko; Paudel; Uehara, 2022; Schoss *et al.*, 2022; Yan *et al.*, 2021). O prenilflavonoide IX apresentou ação contra *Botrytis cinerea*, promovendo danos à membrana celular e inibição da germinação de esporos (Yan *et al.*, 2021). O 8-prenilnaringenina (8-PN) demonstrou atividade contra *Trichophyton mentagrophytes*, com eficácia semelhante a griseofulvina (Macchioni *et al.*, 2021). Nanoemulsões de OE de lúpulo também exibiram atividade antifúngica contra *Fusarium graminearum* e redução da produção de micotoxinas (Jiang *et al.*, 2023). Além disso, extratos de diferentes tecidos vegetais do lúpulo apresentaram atividade antifúngica contra *Zymoseptoria tritici*, sendo observados efeitos sinérgicos com fungicidas sintéticos (Bocquet *et al.*, 2018).

Os fitoquímicos do lúpulo também demonstraram atividade antiviral contra herpesvírus oral, vírus influenza, hepatite C, HIV-1 e SARS-CoV-2 (Abiko; Paudel; Uehara, 2022; Di Soto *et al.*, 2018). Em relação à atividade antitumoral, os ácidos amargos promovem apoptose em células malignas (Zhang *et al.*, 2021). A humulona foi um dos primeiros compostos relatados com capacidade de induzir apoptose em células

leucêmicas (Tobe *et al.*, 1997). Lupulona, colupulona e derivados semissintéticos também apresentaram efeitos antiproliferativos em diferentes linhagens tumorais humanas (Steplan; Ngo; Nutter, 1998). Os mecanismos envolvidos incluem a modulação das vias de sinalização ERK1/2 (quinases reguladas por sinais extracelulares 1 e 2), AP-1 (proteína ativadora 1) e NF- κ B (fator nuclear kappa B), as quais desempenham papéis fundamentais na regulação da proliferação celular, resposta inflamatória, diferenciação e apoptose. (Saugspier *et al.*, 2012), além da interferência na biossíntese de prostaglandina E2 (Lin *et al.*, 2019).

O XN destaca-se por seu potencial antitumoral multialvo, atuando de forma dose-dependente (Blanquer; Oliver; Valle, 2013). Esse prenilflavonoide promove apoptose e modula importantes vias de sinalização celular, incluindo a PI3K/Akt (fosfatidilinositol 3-quinase/proteína quinase B), a NF- κ B e a MAPK/ERK (proteína quinase ativada por mitógeno/quinase regulada por sinais extracelulares), que estão envolvidas na regulação da proliferação celular, sobrevivência, inflamação e morte celular programada, além de aumentar a geração de espécies reativas de oxigênio em células tumorais (Blanquer; Oliver; Valle, 2013; Sławińska-Brych *et al.*, 2021; Bolton *et al.*, 2019; Ramazzina; Macchioni, Carbone, 2022). Estudos relataram efeitos promissores do xanthohumol em cânceres gástrico, colorretal, mama, melanoma e carcinoma nasofaríngeo (Hsieh *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2016; Wolf *et al.*, 2022; Turdo *et al.*, 2021). Outros prenilflavonoides, como 8-PN e isoxanthohumol, também apresentaram potencial quimiopreventivo, especialmente relacionado à modulação do metabolismo de estrogênio e da expressão de aromatase (Wang *et al.*, 2016).

O OE de lúpulo também demonstrou atividade citotóxica, especialmente atribuída ao β -cariofileno e ao óxido de β -cariofileno (Rutnik; Knez; Joze, 2021). Ensaios in vitro mostraram seletividade do OE contra linhagens leucêmicas humanas, embora tenham sido observados efeitos citotóxicos em células normais (Ovidi *et al.*, 2022).

O potencial antioxidante do lúpulo está associado principalmente aos flavonóis, ácidos amargos e prenilflavonoides (Biendl; Pinzl, 2007). Os ácidos amargos apresentam capacidade de eliminação de radicais livres e inibição da peroxidação lipídica (Tagashira; Watanabe, 1995). Estudos recentes demonstraram que a atividade antioxidante dos β -ácidos depende da concentração de colupulona (Yang *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2022). Extratos ricos em polifenóis exibiram elevada capacidade antioxidante in vitro e proteção

contra danos oxidativos ao Ácido Desoxirribonucleico (DNA), além de efeitos protetores in vivo sobre enzimas antioxidantes hepáticas (Wang *et al.*, 2014).

A atividade antioxidante também varia conforme o método de extração empregado. Extrações assistidas por ultrassom e o uso de solventes eutéticos profundos naturais resultaram em extratos com elevada capacidade antirradical (Macchioni *et al.*, 2021; Santarelli *et al.*, 2022). Além dos cones, rebentos de lúpulo selvagem também demonstraram potencial antioxidante relevante (Maietti *et al.*, 2017). Estudos comparativos entre cultivares indicaram diferenças na capacidade de eliminação de radicais e redução de íons metálicos, associadas aos teores de α -ácidos, prenilflavonoides e OEs (Maliar *et al.*, 2017). O 8-PN apresentou atividade antioxidante dose-dependente, embora inferior à observada para o XN (Pohjanvirta; Nasri, 2022). Frações enriquecidas em humulonas, lupulonas e XN também demonstraram capacidade de reduzir significativamente o estresse oxidativo em testes de peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas (Kontek *et al.*, 2021).

A Tabela 1 apresenta estudos que demonstram a bioatividade dos OEs de lúpulo e de extratos obtidos por diferentes solventes, provenientes de distintas variedades de *Humulus lupulus*. Além disso, são especificados os métodos de caracterização química utilizados, como cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), cromatografia gasosa bidimensional abrangente acoplada à espectrometria de massas (GC×GC-MS), cromatografia gasosa bidimensional abrangente acoplada ao detector por ionização em chama (GC×GC-FID), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia líquida de ultra desempenho com detector de arranjo de fotodiodos (UPLC-PDA), cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS), espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-Vis), cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em tandem (UHPLC-MS/MS) e ressonância magnética nuclear (RMN).

Tabela 1. Alguns Estudos descritos na literatura sobre a Bioatividade dos Constituintes Químicos dos Lúpulos.

Parte da Planta	Localização da Coleta	Método de Extração/ Caracterização	Rendimento	Constituintes Químicos	Bioatividade/ Aplicação	Referência
ÓLEO ESSENCIAL						
Lúpulo em <i>Pellets</i> Variedade <i>Chinook</i>	Fornecido pela Cervejaria Ágape (Indústria de Bebidas Artesanais (Especiais) Missioneira Ltda: Barão de Cotegipe, RS)	Hidrodestilação CG-EM	0,67, 0,78 e 0,85% em massa de OE por massa de lúpulo peletizado (m/m)	α -humuleno, β -mirceno e β -cariofileno	Atividade antibacteriana <i>Lactobacillus brevis</i> e <i>Lactobacillus casei</i>	Duarte, P. F. <i>et al.</i> , 2023
<i>Pellets</i> de variedades diferentes de <i>Humulus lupulus</i> L. da Polônia: <i>Iunga</i> , <i>Marynka</i> , <i>Sybilla</i> , <i>Magnum</i> , <i>Tradition</i> e <i>Chinook</i>	Polônia	Hidrodestilação para obtenção de OEs	Variou de 0,60% a 1,50% o rendimento dos OEs	mirceno, α -humuleno e β -cariofileno	A atividade antibacteriana contra oito cepas de cocos patogênicos humanos: <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA (ATCC 43300), <i>S. aureus</i> MRSA (29213), <i>S. aureus</i> MSSA (ATCC 29213), <i>S. epidermidis</i> (ATCC 12228), <i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212), <i>E. faecalis</i> VRE (ATCC 51299), <i>E. faecium</i> (ATCC 19434) e <i>Micrococcus luteus</i> (ATCC 10240).	Piasecki, B.; Biernasiuk, A.; Ludwiczuk, A. 2023
Cones de lúpulo peletizados (<i>Pellets</i>)	Amostras Brasileiras: Juquiá (SP) Taguaí (SP) Fartura (SP)	Destilação a vapor obtenção dos OEs GC $\times$ GC-MS	OEs variedades brasileiras: 0,38 a 1,66 mL/100g	Mirceno, α -humuleno, cariofileno, β -selineno, α -selineno, β -pineno, β -farneseno, linalol, γ -	O estudo avaliou principalmente qualidade química, potencial aromático e características sensoriais para aplicação cervejeira	Pereira, L. F. <i>et al.</i> , 2025

<i>Cascade, Comet e Sorachi Ace</i>	Amostras importadas: Estados Unidos Alemanha, Japão	GC × GC–FID e determinação de α - e β -ácidos por métodos oficiais ASBC (CLAE)	OEs variedades importadas: 0,80 a 3,19 mL/100g	cadineno, selina-3,7(11)-dieno, β -cadineno e α - e β -ácidos		
<i>Pellets Nugget, Cascade, Columbus, Fuggle, Magnum e Chinook</i>	Fornecido pela Órbigo Valley SL (Villamor de Órbigo, León, Espanha)	Os OEs foram extraídos por destilação a vapor, utilizando um aparelho de destilação Clevenger	Não Informado	mirceno, α -humuleno e β -cariofileno	Atividade antibacteriana contra <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> Atividade antifúngica contra <i>A. niger</i>	Paniagua-García, A. I.; Ibáñez, A.; Díez-Antolínez, R. (2025)
EXTRATO ETANÓLICO						
<i>Pellets/ grânulos de lúpulo</i>	Fornecidos pela Taiwan Tobacco and Liquor Corporation (Taipei, Taiwan)	Extração de <i>pellets</i> de lúpulo com água quente a 90 °C e soluções de etanol (55%, 75% e 95%)	Não Informado	α - e β -ácidos, fenólicos totais e flavonoides totais	Atividade antioxidante e anti-inflamatória	Wu, C. <i>et al.</i> , 2020
Cones de lúpulo (<i>Humulus lupulus</i> L.)	Bom Jardim, Nova Friburgo RJ	Extração Etanólica CLAE	Não Informado	α -ácidos e β -ácidos	Atividade antioxidante (ABTS e DPPH), antibacteriana contra <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella Typhimurium</i> e	Arruda, T. R. <i>et al.</i> , 2021

	São Bento do Sapucaí, Serra da Mantiqueira SP				<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , além de atividade antifúngica contra <i>Byssoschlamys nivea</i>	
Cones de lúpulo	Cultivar polonesa Marynka	Extrato Metanólico UPLC-PDA	Não Informado	Caracterização de um total de 27 metabólitos entre eles: α - e β - ácidos, xantohumol, derivados oxidados de ácidos amargos	Atividade antirradical e antioxidante <i>in vitro</i>	Kontek, B. <i>et al.</i> , 2021
<i>Humulus lupulus</i> L.	Não Informado	Extrato CO ₂ supercrítico	Não informado	Acilfloroglucinóis humulona, cohumulona, adhumulona, xantohumol, compostos fenólicos/flavonoides	Teste de citotoxicidade MTT, ensaios de inibição de unidades formadoras de placas, ensaios em diferentes estágios da infecção viral	Mandova, T. <i>et al.</i> , 2023
<i>Pellets</i> de variedades diferentes de <i>Humulus lupulus</i> L. da Polônia: <i>Iunga</i> , <i>Marynka</i> , <i>Sybilla</i> , <i>Magnum</i> ,	Polônia	Extratos metanólicos LC-MS	Não Informado	xantohumol, α -ácidos, β -ácidos e flavonoides prenilados.	A atividade antibacteriana contra oito cepas de cocos patogênicos humanos: <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA (ATCC 43300), <i>S. aureus</i> MRSA (29213), <i>S. aureus</i> MSSA (ATCC 29213), <i>S. epidermidis</i> (ATCC 12228), <i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212), <i>E. faecalis</i> VRE (ATCC	Piasecki, B.; Biernasiuk, A.; Ludwiczuk, A. 2023

<i>Tradition e Chinook</i>					51299), <i>E. faecium</i> (ATCC 19434) e <i>Micrococcus luteus</i> (ATCC 10240)	
Infrutescência do lúpulo	Não Informado	Extração dos compostos ativos do lúpulo utilizando uma variedade de solventes eluotrópicos: hexano, clorofórmio, acetona, etanol a 95% e etanol a 70% cromatografia em camada fina, UV-Vis, LC-MS	Não Informado	Flavonoides prenilados e acilfloroglucídeos.	Atividade antibacteriana <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Streptococcus</i>	Khaliullina, A. <i>et al.</i> , 2024
<i>Pellets Nugget, Cascade, Columbus, Fuggle, Magnum e Chinook</i>	Fornecido pela Órbigo Valley SL (Villamor de Órbigo, León, Espanha)	Extração sequencial	Não Informado	α -ácidos e β -ácidos em resinas macias, xantohumul, resinas duras e compostos fenólicos em resíduos sólidos.	Atividade antibacteriana contra <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> Atividade antifúngica contra <i>A. niger</i>	Paniagua-García, A. I.; Ibáñez, A.; Díez-Antolínez, R. (2025)
Cones e folhas das variedades	Região noroeste do estado do Paraná	Extração Etanólica UHPLC-MS/MS	Cones: variou de 22,99% a 28,06%	Ácidos fenólicos e orgânicos, flavonoides, aldeídos fenólicos,	Ações antioxidantes e fotoprotetoras dos compostos fenólicos	Silva, G. C. C. <i>et al.</i> , 2025

<i>Cascade, Columbus, Comet e Nugget</i>			Folhas: variou de 13,65% a 17,65%	alcaloides e lactonas do tipo α -benzopirona		
Flores Pistiladas <i>Humulus lupulus</i> L.	Coletadas na China	Extrato alcoólico Espectro de RMN de ^1H RMN de ^{13}C HPLC quiral Análises espectroscópicas abrangentes, cristalografia de raios X e cálculos de dicroísmo circular Eletrônico	Não Informado	9 novos compostos dos ácidos amargos do lúpulo que até o momento não havia sido descrito	Atividades anti-inflamatórias e antivirais contra o vírus da dengue.	Sun, B. <i>et al.</i> , 2025

Fonte: Própria autora

4 Material e Método

4.1 Material Vegetal

Foram coletadas inflorescências femininas de quatro variedades de lúpulo (*Humulus lupulus* L.) *Cascade*, *Comet*, *Magnum* e *Zeus*, provenientes da safra de 2025. As flores foram colhidas em estágio adequado de maturação fisiológica, seguindo práticas padronizadas de manejo pós-colheita. Após a colheita, o material vegetal foi submetido aos processos de secagem e pelletização, a fim de garantir sua estabilidade química e reduzir a umidade para níveis compatíveis com o armazenamento e posterior análise laboratorial. As plantas utilizadas neste estudo foram cultivadas durante o ano de 2025 na Fazenda Fruta Rio, localizada na zona rural Fazenda Boa Vista, povoado Paraguai, no município de Cajuri, Minas Gerais, Brasil, sob as coordenadas geográficas 20°45'39.0'' S e 42°46'10.2'' W. O cultivo foi conduzido sob manejo agrícola padronizado pelo produtor Dr. Marcelo Amaral de Moura, responsável técnico e proprietário da empresa Lúpulo Viçosa, garantindo rastreabilidade e uniformidade das condições de produção.

4.2 Óleo Essencial

As amostras em *pellets* das diferentes variedades de lúpulo foram trituradas com auxílio de pistilo. Em seguida, 150 g do material triturado foram submetidos à hidrodestilação, utilizando 1 L de água destilada, em aparelho de Clevenger modificado, durante 3 h, com posterior coleta do hidrolato (HD). O OE foi obtido do HD por partição líquido-líquido com diclorometano, seco com sulfato de sódio anidro, filtrado e concentrado em rotaevaporador, obtendo o OE puro (Pinheiro *et al.*, 2015). Vale ressaltar que as extrações dos OEs de todas as variedades de lúpulo foram realizadas em triplicata, conforme apresentado no Esquema 1..

A umidade das amostras foi determinada pelo método de destilação em aparelho de Dean-Stark. Para cada análise, foram utilizados 5 g de amostra triturada de cada variedade de lúpulo e 80 mL de cicloexano, mantendo-se o sistema em destilação por 2 h (Pinheiro *et al.*, 2015). O rendimento dos OEs foi calculado utilizando-se as seguintes equações:

Umidade

$$U = \frac{\text{volume de água medido na escala volumétrica de Dean \& Stark}}{\text{massa da amostra}} \times 100 \quad [1]$$

Porcentagem massa seca

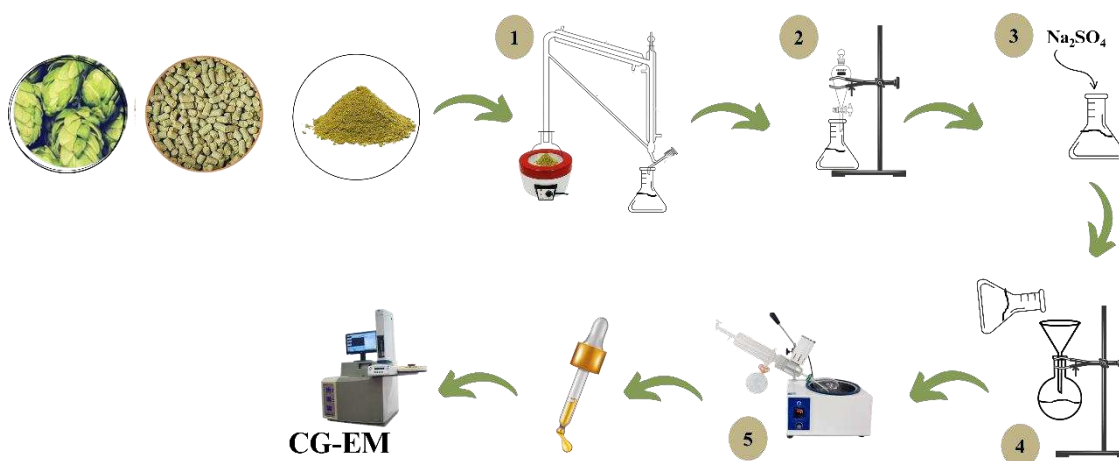
$$\% \text{ massa seca} = \frac{(\text{massa da planta úmida} - \text{massa da água})}{\text{massa da planta úmida}} \times 100 \quad [2]$$

Rendimento OE (ROe)

$$\text{massa da planta úmida} \times \% \text{ massa seca} = \text{massa da planta seca} \quad [3]$$

$$ROe = \frac{\text{massa do OE}}{\text{massa da planta seca}} \times 100 \quad [4]$$

Esquema 1. Extração dos OEs dos lúpulos (*Cascade*, *Comet*, *Magnum* e *Zeus*).



Fonte: Própria autora

4.3 Caracterização do Óleo Essencial por CG-EM

Para a análise da composição química foram preparadas soluções de 10 mg de cada OE em 1 mL de etanol (grau CLAE). Uma alíquota de 1 μL foi introduzida no equipamento modelo CG-EM QP2010C Ultra Mass Spectrometer (Shimadzu), operando no modo de injeção split, adotando-se uma razão de 1:10. O sistema de detecção operou sob o modo de ionização por impacto de elétrons (70 eV). A aquisição dos dados ocorreu no modo de varredura contínua (scan), monitorando-se a faixa de íons razão massa carga (m/z) compreendida entre 35 e 400. No que se refere às condições térmicas do detector, as temperaturas da fonte de íons e da linha de transferência (interface) foram ajustadas para 200 °C e 240 °C, respectivamente.

A fase estacionária usada foi a coluna capilar de sílica fundida SPB-5 (30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de filme), o gás de arraste utilizado foi o hélio. A temperatura do injetor de 220 °C e do detector de 300 °C. A temperatura inicial da coluna foi de 40 °C, sendo programada com incrementos de 5 °C por minuto, até atingir a temperatura máxima de 300 °C. O fluxo da coluna usado foi

de 1,60 mL min⁻¹. Para a identificação dos compostos os espectros de massas obtidos foram comparados com os existentes no banco de dados do equipamento (espectroteca NIST), com dados da literatura e pelos seus respectivos índices de retenção linear (IRL) (Pinheiro *et al.*, 2015).

Os IRLs foram calculados através da equação abaixo respectivamente para cada um dos compostos e comparado com os valores da literatura (Adams, 2017).

$$IRL(X) = 100P_z + 100\left[\frac{(RT_x - RTP_z)}{(RTP_{z+1} - RTP_z)}\right] \quad [5]$$

Onde:

X: é o composto de interesse;

P_z: é o número de átomos de carbono do hidrocarboneto com tempo de retenção imediatamente anterior ao tempo de retenção de X;

RT_x: é o tempo de retenção de X;

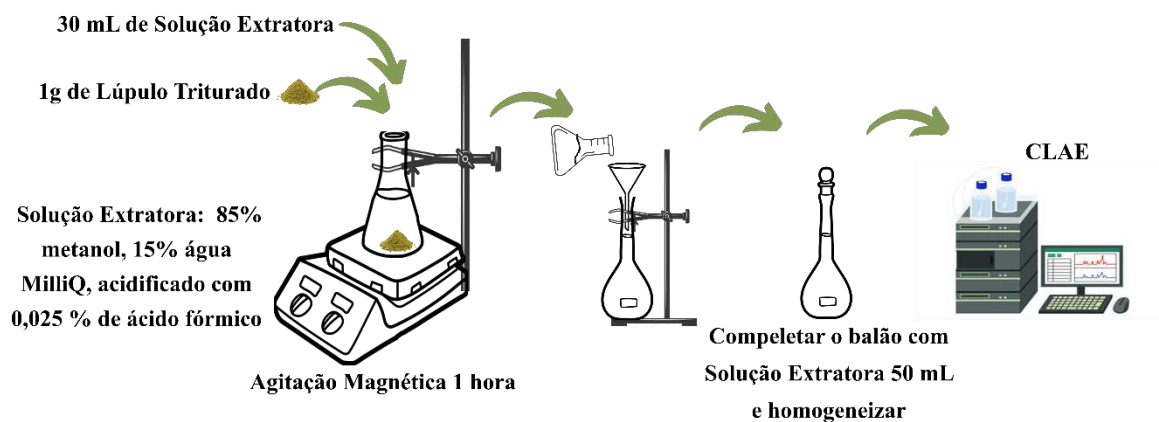
RTP_z: é o tempo de retenção de Z;

RTP_z + 1: é o tempo de retenção do hidrocarboneto com tempo de retenção imediatamente posterior ao tempo de retenção de X.

4.4 Determinação α e β -Ácidos por CLAE

Para a determinação α e β -ácidos dos *pellets* a extração dos referidos ácidos foram realizadas utilizando uma mistura de: 85% de metanol (grau CLAE da Sigma Aldrich): 15% de água MilliQ acidificada com 0,025% de ácido fórmico. Uma quantidade de 1,00g de lúpulo triturado foi pesado, nesse material foram adicionados 30 mL da solução extratora. A mistura foi agitada por 1 h em temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada a filtração, o filtrado obtido foi transferido para um balão volumétrico de 50 mL e o volume foi completado com a solução extratora (Esquema 2) (Danenhower *et al.*, 2008 com adaptações). Vale ressaltar que esse procedimento foi realizado em triplicata para cada variedade de lúpulo.

Esquema 2. Preparo dos *pellets* dos lúpulos *Cascade*, *Comet*, *Magnum* e *Zeus* para determinação dos α e β -ácidos.



Fonte: Própria autora

As análises foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em um cromatógrafo da marca Shimadzu (modelo M10AVP), com coluna de fase reversa C-18 Shimadzu (150 mm de comprimento x 4,6 mm diâmetro interno). O sistema encontrara-se acoplado a um detector espectrofotométrico UV/visível Shimadzu (modelo SPD-10A), conectado por interface (CBM-101) a um microcomputador para processamento de dados. As condições de análise utilizadas foram: fluxo de 0,8 mL/min; fase móvel: 85% de metanol (grau CLAE da Sigma Aldrich): 15% de água MilliQ acidificada com 0,025% de ácido fórmico; temperatura ambiente e comprimento de onda de 326 nm (Danenhowe *et al.*, 2008 com adaptações).

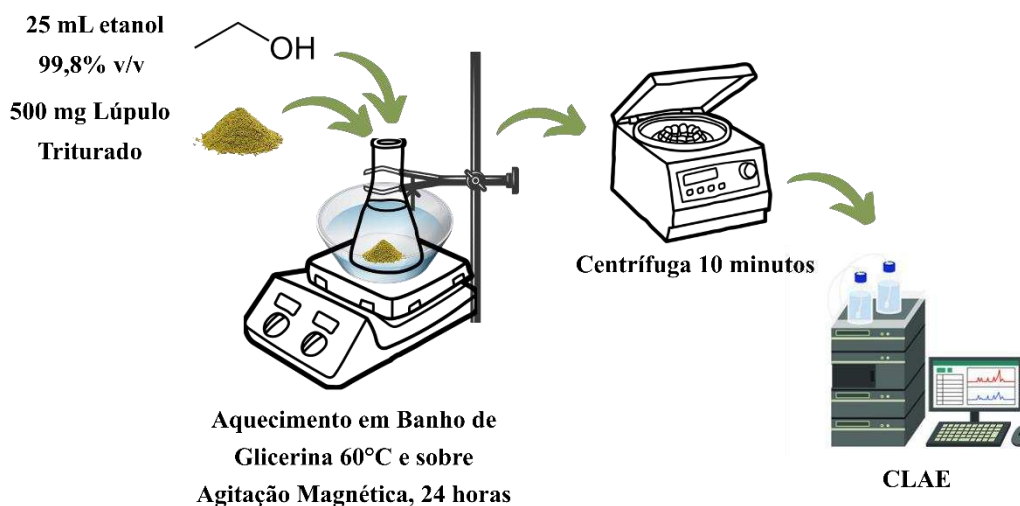
Foi utilizado o padrão ICE-4 (Extrato de Calibração Internacional 4), adquirido da empresa americana ASBC nos Estados Unidos. Para preparação dos pontos da curva foi utilizado 300 mg do padrão diluído para 50 mL de metanol acidificado com 0,025% v/v de ácido fórmico. As concentrações utilizadas de ICE-4 para a obtenção das curvas analíticas foram de: 6,0000 mg/mL; 3,0000 mg/mL; 1,500 mg/mL; 0,7500 mg/mL; 0,3750 mg/mL e 0,1875 mg/mL (Dekeukeleire *et al.*, 2003 com adaptações).

A quantificação dos α - e β -ácidos nos EEs das variedades de lúpulo *Cascade*, *Magnum*, *Comet* e *Zeus* foi realizada utilizando a mesma metodologia adotada para a análise dos lúpulos em *pellets*.

4.5 Obtenção dos Extratos Etanólicos

As amostras em *pellets* das diferentes variedades de lúpulo foram trituradas com auxílio de pistilo. Em seguida, 500 mg do material triturado foram homogeneizados com 25 mL de etanol 99% (v/v). A extração foi conduzida a 60°C, durante 24 h, em banho de glicerina sob agitação. Após esse período, os extratos foram resfriados à temperatura ambiente e, posteriormente, centrifugados por 10 min. O sobrenadante obtido foi concentrado no rotaevaporador para obtenção do extrato puro e armazenado sob -12°C até o momento das análises (Abram *et al.*, 2015 com adaptações). Vale ressaltar que o procedimento para obtenção dos EEs de todas as variedades de lúpulo foram realizados em triplicata (Esquema 3).

Esquema 3. Preparo dos EEs dos lúpulos (*Cascade*, *Comet*, *Magnum* e *Zeus*).



Fonte: Própria autora

4.6 Análise de Componentes Principais (PCA)

A análise multivariada foi conduzida no software RStudio 2026.05.1 com R 4.5.1, utilizando os pacotes “factoextra”, “cluster”, “ggplot2” e “ggrepel”. Inicialmente, os dados foram padronizados e submetidos à Análise de Componentes Principais (PCA) com escala automática. O número ótimo de clusters foi determinado pelo método da silhueta, restringindo-se entre 2 e 5 agrupamentos. A clusterização foi realizada via algoritmo k-means sobre as duas primeiras componentes principais, com 25 inicializações aleatórias. O biplot completo foi gerado combinando a projeção dos indivíduos, os vetores das variáveis originais amplificados por fator 2,5 e elipses de confiança (95%) para cada

cluster, garantindo visualização simultânea da estrutura de dados, contribuição das variáveis e formação dos grupos.

4.7 *Quantificação de Compostos Fenólicos*

O teor de fenólicos totais foi determinado pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu. Inicialmente, foram preparadas as seguintes soluções: carbonato de sódio a 10% foi obtida pela dissolução de 10,06 g de Na_2CO_3 em água destilada, completando-se o volume para 100 mL em balão volumétrico. A solução de Folin-Ciocalteu a 3% foi preparada pela diluição de 3 mL do reagente em água destilada para volume final de 100 mL. A solução padrão estoque de ácido gálico (200 mg/L) foi preparada pela diluição de 0,0101 g de ácido gálico 99% em 50 mL do solvente utilizado na extração das amostras. As soluções foram armazenadas em frascos âmbar (Pérez; Dominguez-López; Lamuela-Raventós, 2023).

Para a construção da curva de calibração, alíquotas da solução padrão de ácido gálico foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL, obtendo-se concentrações finais de 20, 40, 60, 80 e 100 mg AG/L. Em tubos de ensaio âmbar, foram adicionados 0,5 mL de cada solução padrão e 5,5 mL da solução de Folin-Ciocalteu a 3%, em triplicata. Os tubos foram agitados em vórtex por 10 segundos e mantidos em repouso por 5 minutos. Em seguida, adicionou-se 0,5 mL da solução de carbonato de sódio a 10%, seguido de nova agitação por 10 segundos e repouso por 60 minutos, à temperatura ambiente e na ausência de luz. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 765 nm, utilizando-se o branco preparado com o solvente de extração e a solução de Folin-Ciocalteu. A curva de calibração foi construída a partir dos valores de absorbância em função das concentrações de ácido gálico (Pérez; Dominguez-López; Lamuela-Raventós, 2023).

As amostras foram previamente submetidas à extração conforme procedimento apropriado. Em seguida, em tubos de ensaio âmbar, foram adicionados 0,5 mL do extrato da amostra e 5,5 mL da solução de Folin-Ciocalteu a 3%, em triplicata. Após agitação em vórtex por 10 segundos e repouso por 5 min, adicionou-se 0,5 mL da solução de carbonato de sódio a 10%. Os tubos foram novamente agitados por 10 segundos e mantidos em repouso por 60 minutos, à temperatura ambiente e protegidos da luz. As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro a 765 nm. A concentração equivalente de ácido gálico (EAG) nos extratos foi determinada a partir da equação da reta obtida na curva de calibração (Pérez; Dominguez-López; Lamuela-Raventós, 2023).

4.8 Atividade Antimicrobiana

4.8.1 Microrganismos e condições de cultivo

Todos os ensaios realizados com os microrganismos foram conduzidos com 4 cepas de interesse clínico (Tabela 2), armazenadas a -20°C em meio de infusão de cérebro e coração (BHI, Becton Dickinson, EUA) suplementado com 30% de glicerol. Antes de cada ensaio, as culturas microbianas foram ativadas em caldo BHI por 24 h a 37 °C.

Tabela 2. Microrganismos utilizados no presente trabalho.

Cepas	Referência
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	ATCC
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	ATCC
<i>Staphylococcus aureus</i> 1013	Caboclo <i>et al.</i> , 2013
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC35984	ATCC

Fonte: Própria autora

4.8.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

As propriedades antimicrobianas dos compostos foram avaliadas através do método de microdiluição, seguindo as diretrizes do Comitê Europeu de Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana (EUCAST), nas concentrações de 500,0 µg/mL até 15,6 µg/mL. Como controle, foi utilizado o DMSO puro, a fim de certificar que o efeito antimicrobiano fosse dos compostos e não da diluição do DMSO; como controle positivo, foi utilizada a gentamicina (Sigma-Aldrich, EUA). Os experimentos foram realizados três vezes de forma independente, e foram calculados a média e o desvio padrão para o valor final do CIM.

4.8.3 Viabilidade Celular

A viabilidade celular dos macrófagos RAW 264.7 foi avaliada utilizando o ensaio de redução do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólico) (Lopes *et al.*, 2025). As células foram cultivadas em meio de cultura DMEM (Meio de Eagle Modificado por Dulbecco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina/estreptomicina a 37 °C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. Para a avaliação da citotoxicidade dos OEs, as células foram semeadas em placas de 96 poços na densidade de 1×10^5 células por poço em 200 µL de meio DMEM e deixadas para aderir por 24 h. Em seguida, as células foram tratadas com os OEs nas concentrações de

1000 $\mu\text{g/mL}$ a 7,8125 $\mu\text{g/mL}$ diluídos em DMEM por 24 h, sob as mesmas condições de incubação. Células não tratadas serviram como controle negativo, representando 100% de viabilidade celular. Após o tratamento, 50 μL de solução de MTT (0,5 mg/mL) foram adicionados a cada poço e incubados por 3 h a 37 °C para permitir a formação de cristais de formazan. Os cristais de formazan foram dissolvidos com 100 μL de DMSO (dimetil sulfóxido) e a absorbância foi medida a 570 nm usando um leitor de microplacas. O experimento foi realizado em triplicata com três repetições independentes.

4.8.4 *Teste de atividade antibiofilme dos compostos*

O ensaio de inibição da formação de biofilme bacteriano foi conduzido utilizando-se placas de 96 poços. Inicialmente, o inóculo bacteriano foi padronizado em meio de cultura BHI + glicose 1% até atingir a turbidez equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland, correspondendo a uma concentração celular de aproximadamente 1×10^8 UFC/mL. Paralelamente, foram preparadas diluições dos compostos testados em concentrações subinibitórias (1/2 CIM, 1/5 CIM e 1/10 CIM), determinadas previamente a partir da CIM (Purgato *et al.*, 2024).

Na placa de 96 poços, foram transferidos 200 μL dos tratamentos e 5 μL da suspensão bacteriana padronizada. O sistema foi então incubado em estufa bacteriológica sob temperatura controlada de 37 °C por um período de 24h para viabilizar a aderência celular e o subsequente desenvolvimento do biofilme (Purgato *et al.*, 2024).

Após o intervalo de incubação, o sobrenadante contendo as células planctônicas não aderidas foi cuidadosamente removido. Para a quantificação da biomassa do biofilme fixado, adicionou-se a solução de cristal violeta, permanecendo em contato com o material por 15 minutos. Decorrido esse tempo, o excesso de corante foi eliminado por meio de lavagens consecutivas com água destilada, e as placas foram mantidas em temperatura ambiente até a secagem completa. O corante impregnado na matriz do biofilme foi então ressuspensionado e solubilizado com etanol. Por fim, a quantificação foi realizada por meio da leitura da densidade óptica em leitor de microplacas no comprimento de onda de 600 nm (Stepanovic *et al.*, 2007). O crescimento bacteriano juntamente com o DMSO a 0,2% foi utilizado como controle positivo para a formação do biofilme, enquanto o controle negativo foi somente o meio de cultura sem inoculação microbiana.

4.8.5 Determinação do comportamento da combinação dos compostos com antibióticos usando ensaio checkerboard

A atividade combinada dos compostos com os antimicrobianos foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo, utilizando o sistema checkerboard (Bellio *et al.*, 2021). Inicialmente, foram preparadas suspensões bacterianas a partir de colônias previamente cultivadas, ajustadas à turbidez equivalente a 0,5 da escala de McFarland, correspondente a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Posteriormente, foram preparadas diluições seriadas dos OEs e EEs e dos antimicrobianos, sendo distribuídas em uma microplaca de 96 poços de modo a obter diferentes combinações de concentrações. Após a inoculação da suspensão bacteriana, as placas foram incubadas nas condições apropriadas para cada microrganismo.

Resumidamente, esse método, também conhecido como método do tabuleiro de xadrez, foi empregado para obter a concentração inibitória fracionária (FIC) de misturas de combinações dos OEs e EEs com os antibióticos.

$$FIC A (\text{Antibiótico}) = \frac{MIC (\text{Antibiótico}) \text{ em combinação com OEs ou EE}}{MIC (\text{Antibiótico}) \text{ isolado}} \quad [6]$$

$$FIC B (\text{OEs ou EEs}) = \frac{MIC (\text{OEs ou EEs}) \text{ em combinação com antibiótico}}{MIC (\text{OEs ou EEs}) \text{ isolado}} \quad [7]$$

$$\Sigma FIC = FIC A + FIC B \quad [8]$$

Ou seja:

$$\Sigma FIC = \leq 0,5 \text{ Interação Sinérgica}$$

$$\Sigma FIC = \leq 1,0 \text{ Interação aditiva}$$

$$\Sigma FIC = > 1,0 \text{ Interação antagônica}$$

4.8.6 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. As diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância de uma via (*one-way* ANOVA), seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. Diferenças com valores de $p < 0,05$ foram consideradas substituídas por estatisticamente significativas. As análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism, versão 8.2 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

4.9 Atividade Antiviral

A propagação do vírus Mayaro (MAYV; ATCC VR-66) foi realizada em células C6/36 cultivadas em meio Leibovitz's L-15 (L-15) suplementado com 10% SFB, mantidas a 28 °C. Para a infecção, foram adicionados 150 µL da suspensão viral às culturas celulares, permanecendo em adsorção por 1 h à temperatura ambiente sob agitação constante. Após esse período, foram adicionados 2 mL de meio L-15 suplementado com 2% de SFB, e as células foram incubadas por 48 h a 28 °C. Ao término da incubação, o sobrenadante foi coletado, centrifugado a 1.300 rpm por 6 minutos para remoção de detritos celulares, suplementado com 20% de SFB e armazenado a -80 °C até sua utilização (Ventura *et al.*, 2025).

A titulação viral foi realizada em células Vero pelo método de placas de lise (plaque assay). Para isso, as células foram semeadas em placas de 24 poços na concentração de 1×10^5 células por poço, utilizando meio DMEM suplementado com 10% de SFB e antibióticos. Após atingirem aproximadamente 80% de confluência, o meio de cultura foi removido e as células foram infectadas com 100 µL de diluições seriadas da suspensão viral. As placas permaneceram por 1 h à temperatura ambiente sob agitação constante para permitir a adsorção viral. Em seguida, o inóculo foi removido e adicionou-se 1,5 mL de meio DMEM contendo 1% de carboximetilcelulose e 2% de SFB, na proporção de 2:1. As culturas foram incubadas por 48 h a 37 °C, em atmosfera contendo 5% de CO₂ (Ventura *et al.*, 2025).

Após o período de incubação, as células foram fixadas com solução de formaldeído a 10% por 1 h e coradas com cristal violeta a 5%, permitindo a visualização e contagem das placas de lise. O título viral foi expresso em unidades formadoras de placa por mililitro (PFU/mL), utilizando-se a fórmula a seguir:

$$PFU/mL = \frac{\text{Média do número de placas de lise}}{\text{Volume do inóculo (mL)} \times \text{Diluição}} \quad [9]$$

A avaliação da citotoxicidade dos OEs e dos EEs foi realizada utilizando o ensaio de redução do MTT. Inicialmente os OEs foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) na proporção 1:1 para obtenção das soluções estoques, as quais foram armazenadas a -20°C até o uso, da mesma forma que os EEs. Para o ensaio biológico. As células Vero foram semeadas em placas de 96 poços na concentração de 1×10^4 células por poço, em meio DMEM suplementado com 10% de SFB e antibióticos, sendo incubadas por 24 h a 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO₂ (Ventura *et al.*, 2025).

Após esse período, o meio de cultivo foi removido e adicionaram-se, em triplicata e separadamente, 100 μ L de diferentes concentrações dos OEs ou dos EEs preparados em meio DMEM sem SFB. Para os OEs, o meio continha 0,5% de DMSO como veículo. Como controles experimentais, foram utilizadas células cultivadas apenas em meio DMEM sem SFB e células tratadas com meio DMEM contendo 0,5% de DMSO (maior concentração de DMSO após diluição dos OEs após diluição em meio DMEM). Já para os EEs, foram utilizados como controles experimentais células cultivadas em meio DMEM sem SFB e células tratadas com etanol a 1% v/v (maior concentração de etanol presente após diluição dos extratos em meio DMEM) (Ventura *et al.*, 2025).

Após incubação por 48 h, o meio foi removido e adicionaram-se 100 μ L de solução de MTT (1 mg/mL), mantendo-se as placas incubadas por mais 4 h. Em seguida, a solução de MTT foi cuidadosamente retirada e os cristais de formazan foram solubilizados com 100 μ L de DMSO. A absorbância foi determinada em leitor de microplacas a 540 nm. A partir dos dados obtidos, foi calculada a concentração citotóxica capaz de reduzir a viabilidade celular em 50% (CC₅₀) para cada OE e EE, sendo os controles contendo somente células cultivadas em meio DMEM representando 100% de viabilidade celular. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism versão 8, empregando análise de variância (ANOVA) de uma via seguida de regressão não linear (Ventura *et al.*, 2025).

A atividade antiviral dos OEs e dos EEs frente ao MAYV foi avaliada utilizando concentrações equivalentes à concentração citotóxica de 20% (CC₂₀), previamente determinada. Células Vero foram cultivadas em placas de 96 poços conforme descrito anteriormente. Em seguida, as soluções contendo os OEs e EEs na concentração de CC₂₀ foram previamente incubadas com o vírus na multiplicidade de infecção (MOI), ou seja, proporção de 1 vírus para cada célula por 1 h a 37 °C (Ventura *et al.*, 2025).

Posteriormente, o meio de cultura das células foi removido e adicionaram-se 100 μ L das misturas contendo vírus e os respectivos OEs ou EEs, distribuídas em triplicata. As células permaneceram incubadas por 48 h a 37 °C, em atmosfera de 5% de CO₂. Ao final do período experimental, a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT, conforme descrito anteriormente (Ventura *et al.*, 2025).

Como controles experimentais, foram utilizadas células cultivadas apenas em meio DMEM (controle negativo), consideradas como 100% de viabilidade celular, e células infectadas com 1 MOI de MAYV na ausência dos tratamentos (controle positivo),

consideradas como 0% de viabilidade. Os OEs e EEs que mantiveram viabilidade celular igual ou superior a 50% em relação ao controle negativo foram considerados promissores quanto à atividade antiviral (Ventura *et al.*, 2025).

5 Resultados

5.1 Caracterização do Óleo Essencial

O rendimento dos OEs obtidos das variedades *Cascade*, *Comet*, *Magnum* e *Zeus* foi de 0,05%, 0,25%, 0,24% e 0,25% (m/m), respectivamente. A determinação da umidade pelo método de Dean-Stark indicou que as amostras das variedades *Cascade*, *Comet* e *Magnum* apresentaram-se secas, enquanto a variedade *Zeus* apresentou um teor de umidade de 3,95% (m/m).

Os constituintes voláteis secretados pelas glândulas lupulinas correspondem a cerca de 0,5–3,0% (m/m), da matéria seca do cone de lúpulo e são formados principalmente por terpenos e terpenoides. A composição do OE do lúpulo é determinada por fatores genéticos, estágio de maturação e origem geográfica, além de sofrer alterações significativas durante o amadurecimento, o processamento e o armazenamento justificando o baixo rendimento neste trabalho (Rettberg; Biendl; Garbe, 2018).

Os principais constituintes do OE de lúpulo foram identificados por CG-EM, e os respectivos cromatogramas de íons totais encontram-se disponíveis no Apêndice A. Conforme descrito na literatura, destacam-se os constituintes como: β -Mirceno (0,3–60%), α -Humuleno (2,3–51,2%), β -Cariofileno (0,1–14,7%). Esses constituintes também estão presentes nos OEs analisados no presente estudo, corroborando os achados reportados por Durello *et al.* (2019).

Conforme os dados apresentados na Tabela 3, as quatro variedades analisadas exibiram perfis químicos distintos, o que se evidencia pelas variações nos percentuais de área de seus constituintes majoritários. Observou-se que os OEs de lúpulo das variedades *Cascade*, *Comet*, *Magnum* e *Zeus* apresentaram em comum os seguintes constituintes: *E*-Cariofileno (9,53% a 18,60%), Mirceno (1,25% a 18,16%), α -Humuleno (2,06% a 25,73%), β -Selineno (3,73 a 12,61%) e α -Selineno (2,69% a 25,73%).

Além dos constituintes mencionados, constataram-se particularidades na composição específica de algumas amostras. Os OEs dos lúpulos *Cascade* e *Magnum* destacaram-se por apresentar o constituinte farneseno, com percentuais de área de 11,19% e 9,47%, respectivamente. Observou-se, ainda, a presença de Acetato de geranila nos OEs

dos lúpulos *Comet*, *Magnum* e *Zeus*, correspondendo a percentuais de área de 2,56%, 1,46% e 15,69%, respectivamente.

Conforme estudo de Pereira *et al.* (2025), a composição dos OEs de lúpulos das amostras brasileiras e importadas o OE do lúpulo da variedade *Cascade* foi caracterizada por apresentar α -Humuleno (14-19%), β -E-Farneseno (8-11%) e *E*-Cariofileno (7-9%) como constituintes majoritários. O mesmo trabalho indica que o OE do lúpulo da variedade *Comet* tem predominantemente os constituintes mirceno (19-59% m/m), *E*-Cariofileno (11-24%) e β -Selineno (3-11%). Assim, há coincidência entre os principais constituintes observados neste trabalho (Mirceno, α -Humuleno, *E*-Cariofileno, β -E-Farneseno e β -Selineno) com os relatados que reforçam que os perfis obtidos são típicos de OEs de lúpulo das variedades *Cascade* e *Comet*, ao mesmo tempo em que as variações quantitativas nas áreas relativas podem ser atribuídas a fatores agronômicos, condições climáticas e processamento pós-colheita.

De acordo com Paguet *et al.* (2022), os perfis químicos dos OEs variam entre as diferentes cultivares comerciais de lúpulo, sendo caracterizados principalmente pelas proporções relativas de seus constituintes voláteis majoritários. No OE do lúpulo da variedade *Cascade*, os autores relataram teores de Mirceno entre 45 e 60%, Humuleno entre 8 e 16%, Farneseno entre 4 e 8% e Cariofileno entre 4 e 6%. Para o OE de lúpulo da variedade *Comet*, observou-se predominância de Mirceno (67%), seguido de Cariofileno (10%), Humuleno (1%) e Farneseno (0,1%). Já o OE de lúpulo da variedade *Magnum*, foram descritos teores de Mirceno entre 30 e 35%, Humuleno entre 34 e 40%, Cariofileno entre 8 e 12% e farneseno em aproximadamente 0,1%. Já OE de lúpulo da variedade *Zeus* apresentou concentrações de mirceno variando entre 45 e 55%, Humuleno entre 9 e 14%, Cariofileno entre 5 e 10% e Farneseno inferior a 1%.

A composição dos OEs de lúpulo analisados divergiu da literatura (Paguet *et al.*, 2022) ao apresentar teores drasticamente menores de mirceno. Essa diferença ocorre devido ao estresse térmico gerado pelo método de extração, que degrada e volatiliza o mirceno. Como consequência, há um aumento artificial na proporção relativa de sesquiterpenos mais resistentes ao calor (*E*-Cariofileno e α -Humuleno). A presença de marcadores de oxidação (Epóxido de humuleno II e Óxido de cariofileno) confirma a degradação térmica, concluindo-se que o perfil obtido reflete o método de extração agressivo, e não a composição natural da flor (Almaguer *et al.*, 2014).

No estudo de Paniagua-García *et al.* (2025), o constituinte mirceno foi o constituinte majoritário em todas as variedades avaliadas (*Nugget*, *Columbus*, *Chinook*, *Magnum*, *Cascade* e *Fuggie*), com concentrações variando de 29,70% a 64,00%, seguido por α -Humuleno (14,29–25,74%), β -Cariofileno (5,96–10,39%) e β -Farneseno, este último detectado apenas nos OEs de lúpulos *Cascade* (7,96%) e *Fuggie* (4,37%). Além disso, os teores de linalol e geraniol permaneceram inferiores a 2% na maioria das variedades analisadas.

Em contraste, os OEs avaliados neste trabalho apresentaram um perfil químico distinto, caracterizado por menores concentrações de Mirceno (1,25–18,16%) e maior participação de sesquiterpenos. O α -Humuleno foi um dos principais constituintes dos OEs dos lúpulos *Cascade* (26,14%) e *Magnum* (25,73%), enquanto o β -cariofileno apresentou concentrações entre 9,53% e 18,60%, superiores às relatadas por Paniagua-García *et al.* (2025). Da mesma forma, foram observados teores mais elevados de β -farneseno nos OEs dos lúpulos *Cascade* (11,19%) e *Magnum* (9,47%), além de maiores concentrações de Linalol (1,22–2,39%) e Geraniol, destacando-se o OE de lúpulo da variedade *Zeus*, que apresentou 3,21% desse monoterpreno.

Outra diferença importante foi a identificação de diversos constituintes que não foram relatados na composição química apresentada por Paniagua-García *et al.* (2025), incluindo Acetato de nerila, Acetato de geranila, Geranato de metila, Isobutirato de geranila, α -Copaeno, β -Selineno, α -Selineno, Valenceno, γ -Muuroleno, α -Muuroleno, Ledol, Óxido de cariofileno e Epóxido de humuleno II. A presença desses metabólitos demonstra um perfil químico mais complexo, com maior diversidade de SO e ésteres terpênicos.

Tabela 3. Identificação dos constituintes voláteis dos lúpulos (*Cascade*, *Comet*, *Magnum* e *Zeus*).

Constituintes Identificados	TR (min)	IA calc.	IA lit.	Média da área do pico CG (%)			
				<i>Cascade</i>	<i>Comet</i>	<i>Magnum</i>	<i>Zeus</i>
Mirceno	12,26	982	988	2,05	18,16	12,57	1,25
6-Metil-heptanoato de metila	16,95	1078	1068	-	1,2	-	-
Linalol	17,57	1091	1095	1,22	1,91	2,31	2,39
Geraniol	25,22	1247	1249	-	-	-	3,21
Undecan-2-ona	26,90	1282	1293	-	-	1,56	-
Ácido 4-decenoico	27,63	1298	1289	2,27	4,41	3,98	2,85

Geranato de metila	28,34	1312	1322	2,95	2,11	2,27	3,75
α -Copaeno	30,57	1362	1374	-	-	-	2,98
Acetato de nerila	30,98	1370	1359	6,46	-	-	-
Acetato de geranila	31,19	1375	1379	0	2,56	1,46	15,69
<i>E</i> -Cariofileno	32,55	1405	1417	12,81	18,60	15,13	9,53
β -Cubebeno	32,91	1414	1387	0	-	-	1,53
α - <i>E</i> -Bergamoteno	33,19	1420	1432	1,39	-	-	-
α -Humuleno	34,07	1440	1452	26,14	2,06	25,73	13,07
<i>E</i> - β -Farneseno	34,21	1443	1454	11,19	-	9,47	-
9-epi- <i>E</i> -Cariofileno	34,96	1461	1464	-	-	3,85	-
β -Bisaboleno	35,04	1463	1505	5,09	5,56	-	9,46
β -Selineno	35,40	1472	1489	5,27	12,61	6,27	3,73
α -Selineno	35,77	1480	1498	4,67	11,22	5,22	2,69
γ -Muuroleno	36,02	1486	1478	-	-	-	2,44
<i>Z</i> -Nerolidol	36,60	1499	1531	-	-	4,17	-
α -Muuroleno	36,62	1500	1500	-	-	-	6,96
Isobutirato de geranila	36,72	1502	1514	7,86	4,97	-	5,80
γ -Cadineno	36,86	1506	1513	2,60	-	-	-
δ -Cadineno	37,02	1510	1522	-	-	3,09	5,03
Valenceno	37,44	1520	1496	-	3,92	0	1,69
Selina-3,7(11)-dieno	37,62	1524	1545	-	3,52	1,27	-
Epóxido de humuleno II	40,32	1589	1608	5,09	-	1,65	-
Óxido de cariofileno	40,44	1593	1582	2,95	7,16	-	1,52
Ledol	41,17	1612	1602	-	-	-	4,44
Monoterpenos Hidrogenados				2,05	18,16	12,57	1,25
Monoterpenos Oxigenados				18,49	11,55	6,04	30,84
Sesquiterpenos Hidrogenados				69,16	57,5	70,03	59,11
Sesquiterpenos Oxigenados				8,04	7,16	5,82	5,96
Outros				2,27	5,61	5,54	2,85

TR- Tempo de Retenção; IA calc. - Índice Aritmético calculado; IA lit. - Índice Aritmético da literatura.

Fonte: Própria autora

Na análise e controle de qualidade de OEs, a Análise de Componentes Principais (PCA) atua como uma ferramenta estatística indispensável para simplificar a imensa complexidade química dessas substâncias (Milojevic *et al.*, 2020). Como um único OE pode conter centenas de constituintes voláteis diferentes (como terpenos, álcoois e ésteres) identificados em análises de cromatografia, comparar o perfil aromático,

classificar quimiotipos ou detectar adulterações em dezenas de amostras é uma tarefa computacionalmente desafiadora (Truzzi *et al.*, 2022).

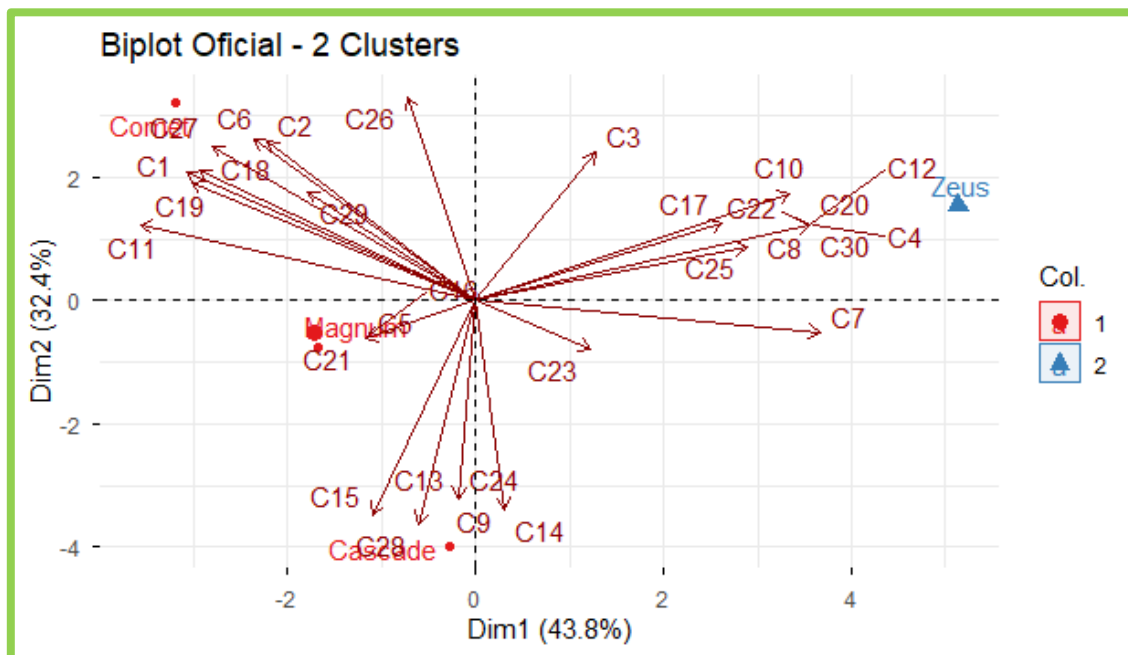
O PCA resolve esse problema condensando as concentrações de todas essas substâncias em um número reduzido de novas variáveis matemáticas, permitindo que pesquisadores projetem os dados em gráficos simples onde OEs puros, amostras de uma mesma região geográfica ou lotes falsificados se agrupam visualmente, revelando padrões de qualidade de forma clara sem perder a essência das informações químicas originais (Truzzi *et al.*, 2022).

Neste trabalho o PCA dos dados químicos explicou 76,2% da variância total acumulada nos dois primeiros componentes (Dim1 = 43,8% e Dim2 = 32,4%) (Figura 8). Esse elevado percentual de variância explicada indica que os componentes principais capturaram a maior parte da variabilidade dos dados, conferindo elevada robustez à discriminação das amostras em função de suas características químicas. A análise de agrupamento automático (clusterização) dividiu os OEs em dois clusters nitidamente distintos ao longo do primeiro componente principal (Dim1).

O Cluster 1 foi constituído de forma isolada e única pelo OE do lúpulo da variedade *Zeus*, localizado no lado positivo da Dim1, enquanto o Cluster 2 englobou as amostras dos OEs dos lúpulos *Comet*, *Magnum* e *Cascade* de forma conjunta no lado negativo da Dim1. Essa divisão macroscópica reflete a existência de dois perfis fitoquímicos perfeitamente contrastantes.

O perfil do Cluster 2 é caracterizado por altas concentrações relativas de um bloco específico de compostos oxigenados, ésteres e sesquiterpenos. Dentre os principais marcadores químicos associados a este quimiotipo, destacam-se o Geraniol (C4), Geranato de metila (C7), α -Copaeno (C8), Acetato de geranila (C10), β -Cubebeno (C12), α -E-Bergamoteno (13), α -Humuleno (14), *E*- β -Farneseno (C15), β -Selineno (C18), γ -Muuroleno (C20), α -Muuroleno (C22), γ -Cadineno (C24), δ -Cadineno (C25) e Ledol (C30). A forte projeção de ésteres e monoterpenos como o C4 e C10 nesta amostra sugere uma atividade enzimática altamente direcionada para a via de biossíntese de derivados de geranila, conferindo ao OE do lúpulo da variedade *Zeus* uma identidade química singular e excludente em relação aos demais.

Figura 8. PCA e agrupamento hierárquico (clusterização) dos perfis químicos dos OEs dos lúpulos (*Cascade*, *Comet*, *Magnum* e *Zeus*).



Mirceno (C1), 6-Metil-heptanoato de metila (C2), Linalol (C3), Geraniol (C4), Undecan-2-ona (C5), Ácido 4-decenoico (C6), Geranato de metila (C7), α -Copaeno (C8), Acetato de nerila (C9), Acetato de geranila (C10), *E*-Cariofileno (C11), β -Cubebeno (C12), α -*E*-Bergamoteno (C13), α -Humuleno (C14), *E*- β -Farneseno (C15), 9-*epi*-*E*-Cariofileno (C16), β -Bisaboleno (C17), β -Selineno (C18), α -Selineno (C19), γ -Muuroleno (C20), *Z*-Nerolidol (C21), α -Muuroleno (C22), Isobutirato de geranila (C23), γ -Cadineno (C24), δ -Cadineno (C25), Valenceno (C26), Selina-3,7(11)-dieno (C27), Epóxido de humuleno II (C28) e Óxido de cariofileno (C29) e Ledol (C30).

Fonte: Própria autora

Por outro lado, as amostras de OEs dos lúpulos *Comet*, *Magnum* e *Cascade* foram agrupadas de forma única no Cluster 1 devido ao compartilhamento de uma base fitoquímica comum, marcada fundamentalmente pela ausência ou por teores vestigiais dos compostos dominantes no OE do lúpulo da variedade *Zeus*. A identidade química deste segundo cluster é definida por um amplo conjunto de monoterpenos voláteis e sesquiterpenos de arrasto que apontam para o lado esquerdo do biplot, tais como o Mirceno (C1), 6-Metil-heptanoato de metila (C2), Linalol (C3), Undecan-2-ona (C5), Ácido 4-decenoico (C6), Acetato de nerila (C9), *E*-Cariofileno (C11), α -*E*-Bergamoteno (C13), α -Humuleno (C14), 9-*epi*-*E*-Cariofileno (C16), β -Bisaboleno (C17), α -Selineno (C19), *Z*-Nerolidol (C21), Isobutirato de Geranila (C23), Valenceno (C26), Selina-3,7(11)-dieno (C27), Epóxido de humuleno II (C28) e Óxido de cariofileno (C29). O

comportamento dos vetores no biplot indica associação positiva entre o α -Muuroleno (C22), γ -Muuroleno (C20), γ -cadineno (C24) e δ -cadineno (C25) indica uma forte correlação positiva, sugerindo que compartilham o mesmo precursor biogenético comum na planta e co-influenciam o perfil do OE do lúpulo da variedade *Zeus*.

Em contrapartida, a oposição angular e o distanciamento desses vetores em relação ao bloco de compostos do Cluster 2 evidenciam um antagonismo biossintético rigoroso entre os dois grupos de OEs. Esses resultados evidenciam diferenças no perfil químico ou indicam agrupamentos distintos entre as variedades analisadas, fornecendo subsídios valiosos para a seleção de genótipos ou lotes comerciais com propriedades industriais, farmacológicas ou aromáticas específicas.

Com relação as classes dos monoterpenos e sesquiterpenos a ordenação multivariada obtida por meio da PCA explicou 76,6% da variância total dos dados nos dois primeiros eixos primários, dos quais o primeiro componente principal (Dim1) reteve 45,1% da variação e o segundo componente (Dim2) foi responsável por 31,5% da inércia remanescente. A análise de agrupamento discriminou explicitamente as observações em dois clusters distintos, o que indica uma clara heterogeneidade estrutural entre as amostras avaliadas.

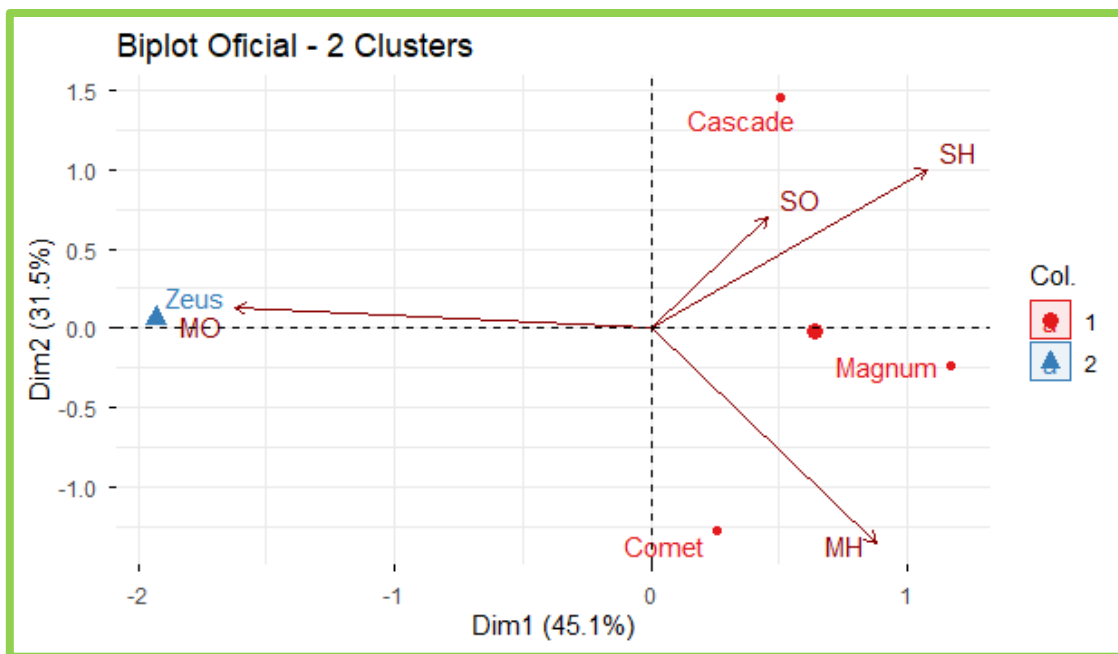
O Cluster 1 agrupou as observações OE do lúpulo da variedade *Cascade*, Sesquiterpenos Oxigenados (SO), Sesquiterpenos Hidrogenados (SH), OEs dos lúpulos *Magnum* e *Comet*, caracterizando-se por escores majoritariamente positivos em Dim1 e por uma forte associação com os vetores direcionais de carregamento. Em contrapartida, o Cluster 2 reuniu as amostras OE do lúpulo da variedade *Zeus* e Monoterpenos Oxigenados (MO), posicionando-se no quadrante oposto com valores negativos extremos de Dim1 (Figura 9).

A distribuição das observações ao longo da Dim 1 evidencia uma clara separação entre os grupos. O OE da variedade *Zeus* apresentou maior associação com a classe dos MO, posicionando-se em região oposta às classes SH, SO e Monoterpenos Hidrogenados (MH). Esse comportamento evidencia a composição química diferenciada do OE da variedade *Zeus* em relação aos demais OEs avaliados.

Ao analisar o comportamento vetorial das variáveis, observa-se que SH e SO exibem vetores com ângulos agudos adjacentes no primeiro quadrante. Esse comportamento indica uma forte correlação linear positiva entre ambas, sinalizando que os fatores que elevam os índices de SH tendem a impulsionar concomitantemente os

níveis de SO, exercendo forte influência sobre o grupo OE de lúpulo da variedade *Cascade*.

Figura 9. PCA e agrupamento hierárquico (clusterização) das classes dos terpenos dos OEs dos lúpulos (*Cascade*, *Comet*, *Magnum* e *Zeus*).



MH: Monoterpenos Hidrogenados. MO: Monoterpenos Oxigenados. SH: Sesquiterpenos Hidrogenados. SO: Sesquiterpenos Oxigenados.

Fonte: Própria autora

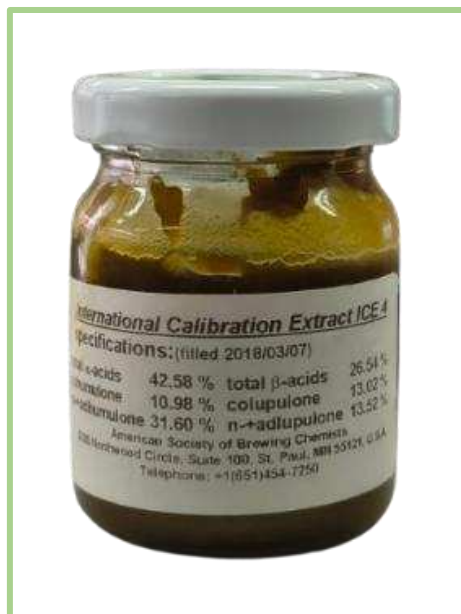
Por outro lado, o vetor representativo da variável MH projeta-se de forma descendente em direção ao quarto quadrante, formando um ângulo próximo a 90° com as variáveis superiores. Essa ortogonalidade sugere independência estatística parcial, demonstrando que a variação observada nas amostras de OEs dos lúpulos *Comet* e *Magnum* sob a ótica de MH é controlada por mecanismos distintos daqueles que regem as respostas de SH e SO. Esses resultados comprovam que a separação em dois clusters reflete assinaturas bem definidas, em que as amostras do Cluster 1 respondem de forma expressiva às variáveis avaliadas, enquanto as do Cluster 2 mantêm-se isoladas devido ao comportamento reverso frente a esses mesmos descritores.

5.2 Determinação dos α e β -ácidos

Para determinação das concentrações dos α e β -ácidos, das variedades de lúpulo, foram feitas inicialmente quatro curvas analíticas, com o extrato de calibração

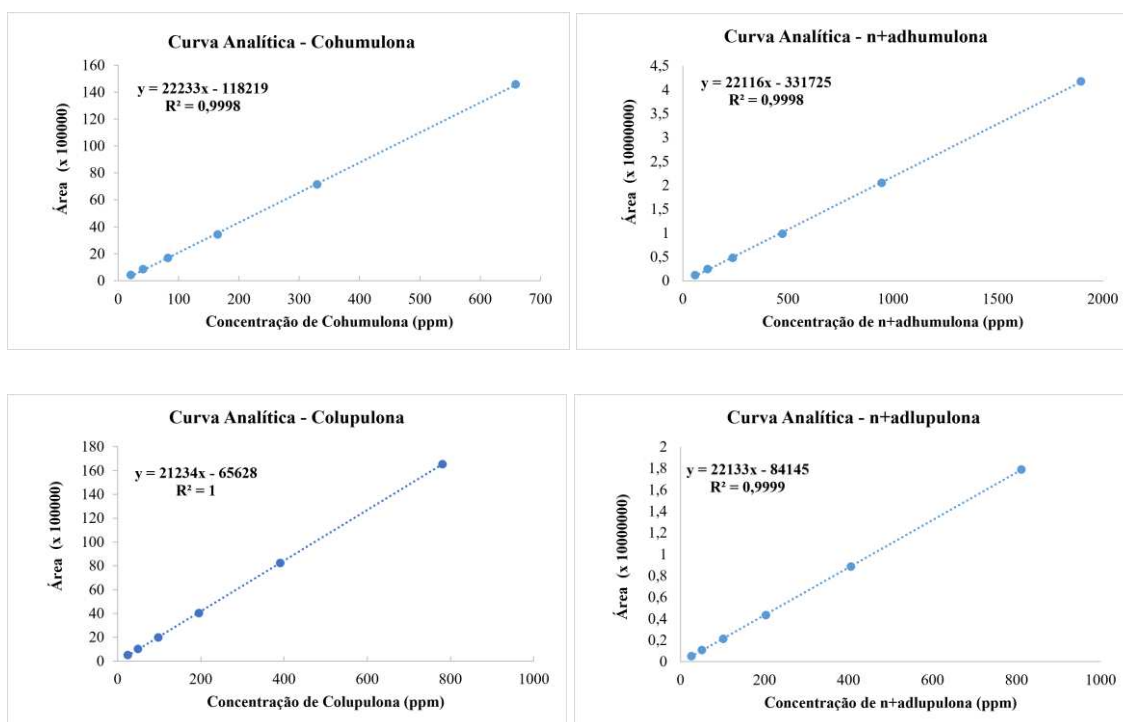
internacional (ICE-4) que continha: 10,98% de cohumulona, 31,60% de n+adhumulona, 13,02% de colupulona e 13,52% de n+adlupulona (Figura 10). Os cromatogramas do padrão estão em Apêndice B e as curvas analíticas estão descritas abaixo (Figura 11).

Figura 10. Padrão ICE-4



Fonte: Própria autora

Figura 11. Curvas Analíticas dos constituintes do padrão ICE-4.



Fonte: Própria autora

A partir das equações das curvas analíticas obtidas para cada constituinte, foram determinadas suas concentrações para cada EE, expressas em partes por milhão (ppm), considerando a área do pico cromatográfico (y) em função da concentração do analito (x) os cromatogramas encontram-se no Apêndice C para os *pellets* e Apêndice D para os EEs. Com os valores de concentração obtidos, foi calculada a massa de cada constituinte por meio da equação ($m = C \times V$), em que m corresponde à massa, C à concentração e V ao volume da solução. Posteriormente, os valores de massa foram utilizados para determinar o teor de cada constituinte, expresso em porcentagem massa/massa (m/m), para cada variedade analisada.

O teor de α -ácidos totais nos pellets de diferentes variedades de lúpulo variou de 2,54 a 9,19% (m/m) (Tabela 4), enquanto o teor de β -ácidos totais variou de 0,60 a 2,17% (m/m) (Tabela 5). De acordo com Olsovská *et al.* (2016), cones de lúpulo secos apresentam teores de α -ácidos entre 2% e 17% e de β -ácidos entre 2% e 10%, valores que variam conforme a variedade cultivada. Pesquisas relatam que, no momento da colheita, o teor médio de α -ácidos situa-se entre 10% e 20% para variedades de amargor, como *Magnum* e *Zeus*, enquanto variedades aromáticas, como *Cascade*, apresentam valores entre 2% e 10% (Almaguer *et al.*, 2014). Além disso, segundo Paguet *et al.* (2022), a variedade *Comet* é classificada simultaneamente como lúpulo de amargor e aromático.

Segundo Paguet *et al.* (2022), as variedades comerciais de lúpulos *Cascade*, *Comet*, *Magnum* e *Zeus* apresentam teores de α -ácidos totais de 4,5–8,9% (*Cascade*), 9,4–12,4% (*Comet*), 12,0–14,0% (*Magnum*) e 13,0–17,5% (*Zeus*). Para os β -ácidos totais, os autores reportaram valores de 3,6–7,5% (*Cascade*), 3,0–6,1% (*Comet*), 4,5–5,5% (*Magnum*) e 4,5–6,5% (*Zeus*). Comparando-se esses resultados com aqueles apresentados nas Tabelas 4 e 5, verifica-se que os *pellets* de lúpulo avaliados neste estudo apresentaram menores teores de α -ácidos, bem como menores teores de β -ácidos em todas as variedades analisadas, em relação aos valores descritos na literatura. Esses achados sugerem que fatores relacionados ao cultivo, às condições ambientais e ao processamento pós-colheita podem ter influenciado a composição química dos pellets, evidenciando a necessidade de aperfeiçoamento das práticas de produção para a obtenção de matéria-prima com maior qualidade química (Arruda *et al.*, 2021; Almaguer *et al.*, 2014).

Tabela 4. Porcentagens de α -ácidos nos *pellets* de lúpulos (*Cascade*, *Comet*, *Magnum* e *Zeus*).

α -Ácidos % (m/m)			
Amostras	Cohumulona	n+adhumulona	α -Ácidos Totais
<i>Cascade</i>	1,22±0,02	2,92±0,01	4,14±0,01
<i>Comet</i>	3,89±0,01	5,30±0,05	9,19±0,04
<i>Magnum</i>	1,56±0,01	6,25±0,01	7,81±0,04
<i>Zeus</i>	0,86±0,11	1,68±0,02	2,54±0,11

Fonte: Própria autora

Tabela 5. Porcentagens de β -ácidos nos *pellets* de lúpulos (*Cascade*, *Comet*, *Magnum* e *Zeus*).

β -Ácidos % (m/m)			
Amostras	Colupulona	n+adlupulona	β -Ácidos Totais
<i>Cascade</i>	0,65±0,02	1,07±0,01	1,72±0,01
<i>Comet</i>	0,77±0,01	1,09±0,04	1,86±0,04
<i>Magnum</i>	0,97±0,01	1,20±0,01	2,17±0,01
<i>Zeus</i>	0,30±0,02	0,30±0,06	0,60±0,11

Fonte: Própria autora

A ordem crescente em relação ao teor de α -ácidos totais encontrados nos EEs dos lúpulos estudados foi: *Zeus*, *Cascade*, *Magnum* e *Comet* (Tabela 6). O EE do lúpulo *Zeus* apresentou o teor de α -ácidos totais igual a 2,54%, com predominância de n+adhumulona (1,70%) em relação à cohumulona (0,84%). Esse valor é inferior ao tipicamente reportado para variedades pertencentes ao grupo CTZ (*Columbus–Tomahawk–Zeus*), usualmente classificadas como cultivares de alto teor de α -ácidos, com valores reportados cohumulona (15,48%) e n+adhumulona (17,99%) (Arruda *et al.*, 2021).

Em relação ao teor de β -ácidos, a ordem crescente dos EEs dos lúpulos estudados foi: *Zeus*, *Comet*, *Magnum* e *Cascade* (Tabela 7). O teor de β -ácidos totais no EE do lúpulo *Zeus* foi de 1,11%, com predominância de colupulona (0,66%) em relação à n+adlupulona (0,45%). Esse resultado é inferior ao relatado por Arruda *et al.* (2021), que identificaram colupulona (10,79%) e n+adlupulona (10,03%).

O estudo conduzido por Arruda *et al.* (2021), utilizando o EE do lúpulo da variedade *Cascade*, quantificou os α -ácidos cohumulona (3,86%) e n+adhumulona (3,11%), bem como os β -ácidos colupulona (3,67%) e n+adlupulona (4,15%). No

presente estudo, também foi empregado o EE do lúpulo da variedade *Cascade*, sendo determinados os teores de α -ácidos de 0,81% para cohumulona e 1,90% para n+adhumulona, enquanto os β -ácidos apresentaram concentrações de 1,60% para colupulona e 1,24% para n+adlupulona.

Arruda *et al.* (2021) realizaram um estudo abrangente com EEs de diferentes variedades de lúpulo, incluindo Spalt, Saaz, Vitória, Mantiqueira, Canastra, Hallertau, Premiant e Brassylijsk. Os autores relataram ampla variação nos teores de α -ácidos totais, entre 4,94 e 33,47%, e de β -ácidos totais, entre 4,06 e 30,37%, evidenciando a influência da variedade sobre a composição química dos extratos. Embora tenham sido observadas diferenças expressivas entre as cultivares avaliadas, algumas variedades apresentaram concentrações de α - e β -ácidos semelhantes às determinadas no presente estudo. Esses resultados indicam que os teores obtidos para as variedades analisadas nesta pesquisa estão inseridos na faixa de variação descrita na literatura para diferentes genótipos de *H. lupulus* L., cultivados sob distintas condições ambientais e de manejo.

Estudos indicam que a estabilidade dos α - e β -ácidos é fortemente influenciada pelas condições de armazenamento (temperatura elevada, presença de oxigênio e luz) e pelo tempo após o processamento, podendo ocorrer degradação oxidativa significativa e, consequentemente, redução do teor de humulonas detectável nos extratos (Almaguer *et al.*, 2014).

Tabela 6. Porcentagens de α -ácidos nos EEs de lúpulos (*Cascade*, *Comet*, *Magnum* e *Zeus*).

α -Ácidos % (m/m)			
Amostras	Cohumulona	n+adhumulona	α -Ácidos Totais
<i>Cascade</i>	0,81±0,01	1,90±0,02	2,71±0,02
<i>Comet</i>	2,07±0,01	3,51±0,01	5,58±0,01
<i>Magnum</i>	1,17±0,01	3,21±0,04	4,38±0,04
<i>Zeus</i>	0,84±0,01	1,70±0,02	2,54±0,02

Fonte: Própria autora

Tabela 7. Porcentagens de β -ácidos nos EEs de lúpulos (*Cascade*, *Comet*, *Magnum* e *Zeus*).

Amostras	β -Ácidos % (m/m)		
	Colupulona	n+adlupulona	β -Ácidos Totais
<i>Cascade</i>	1,60±0,01	1,24±0,01	2,87±0,01
<i>Comet</i>	0,71±0,01	1,19±0,4	1,90±0,04
<i>Magnum</i>	1,52±0,01	1,21±0,01	2,73±0,01
<i>Zeus</i>	0,66±0,01	0,45±0,01	1,11±0,04

Fonte: Própria autora

A análise multivariada por meio do gráfico *biplot* evidenciou que as duas primeiras componentes principais (Dim1 e Dim2) explicaram, de forma combinada, 96,6% da variância total dos dados (56,2% e 40,4%, respectivamente), demonstrando a robustez do modelo estatístico em capturar as diferenças e similaridades bioquímicas entre as cultivares com base no perfil de compostos amargos (Figura 12).

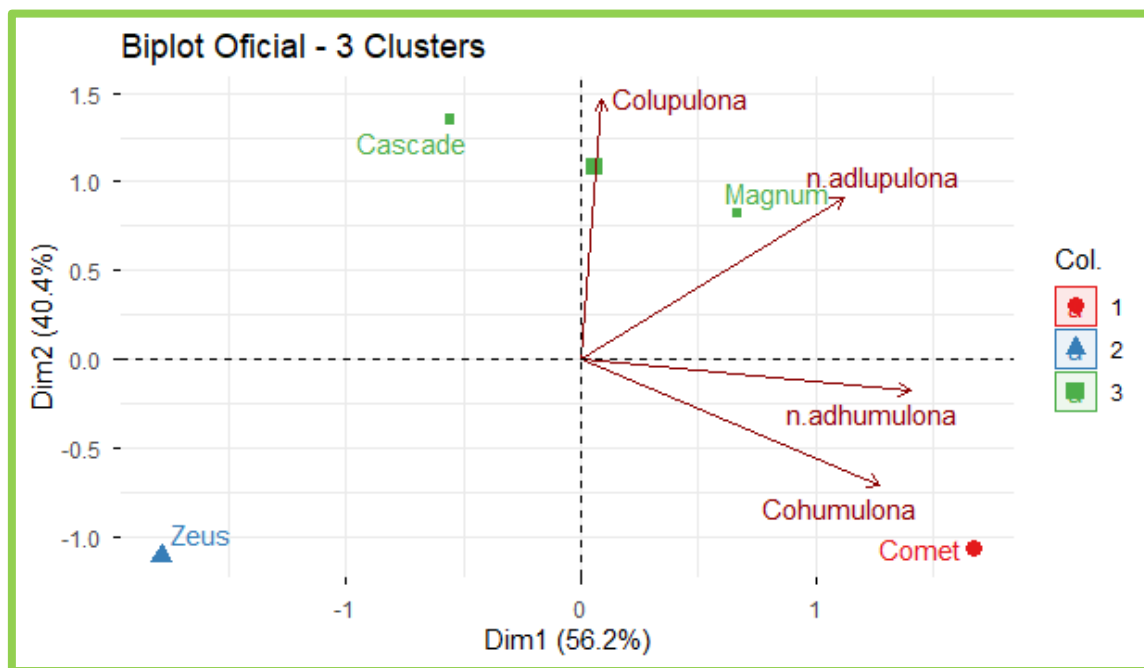
O agrupamento claro dos dados em três clusters distintos corrobora a hipótese de uma forte diferenciação quimiotaxonômica entre as variedades de lúpulo avaliadas, onde o Cluster 1, posicionado no quadrante inferior direito, revelou-se fortemente caracterizado por teores elevados de cohumulona e n+adhumulona, cujos vetores apontam diretamente na direção do EE do lúpulo da variedade *Comet*, indicando uma estreita correlação positiva e uma assinatura química associada a perfis de amargor mais intensos.

Em contrapartida, o Cluster 3 ocupou a porção superior do gráfico, destacando o EE do lúpulo da variedade *Magnum* intimamente associado aos vetores de n+adlupulona e colupulona, o que indica uma composição fenotípica voltada a uma maior concentração de β -ácidos, enquanto o EE do lúpulo da variedade *Cascade* posicionou-se de forma mais isolada no quadrante superior esquerdo, sugerindo um perfil intermediário ou uma composição molecular mais suave dentro deste mesmo grupo.

O resultado mais contrastante, contudo, foi observado para o EE do lúpulo da variedade *Zeus* (Cluster 2), localizado isoladamente no quadrante inferior esquerdo e em posição diametralmente oposta aos vetores de n+adlupulona e n+adhumulona, o que indica geometricamente um perfil de concentrações significativamente baixas desses compostos específicos e qualifica este genótipo como de alto interesse para programas de melhoramento que buscam linhagens contrastantes. Em síntese, esses resultados

demonstram que as variáveis associadas aos α - e β -ácidos não se distribuem de forma homogênea entre as cultivares, validando a eficiência da análise de componentes principais na discriminação de cultivares de lúpulo e fornecendo subsídios práticos para a seleção industrial e classificação de matérias-primas na indústria de bebidas.

Figura 12. PCA e agrupamento hierárquico (clusterização) dos α - e β -ácidos EEs dos lúpulos (*Cascade*, *Comet*, *Magnum* e *Zeus*).

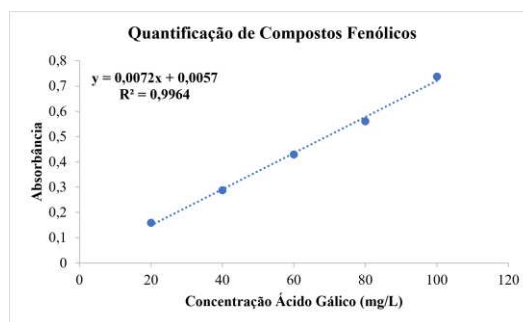


Fonte: Própria autora

5.3 Quantificação de Compostos Fenólicos nos EEs

Para a quantificação dos compostos fenólicos presentes nos EEs, foi elaborada uma curva padrão (Figura 13) utilizando soluções de ácido gálico em diferentes concentrações (20, 40, 60, 80 e 100 mg/L).

Figura 13. Curva Analítica para Quantificação de Compostos Fenólicos.



Fonte: Própria autora

A fim de determinar a concentração real dos EEs obtidos ao final de cada processo de extração, realizado em triplicata, os resíduos remanescentes foram submetidos à secagem e posterior pesagem, permitindo a determinação da massa efetivamente extraída pelo etanol. As amostras foram analisadas após diluição de dez vezes, sendo posteriormente realizada a correção dos valores de concentração fornecidos pelo equipamento, de modo a obter a concentração real dos compostos fenólicos presentes nos EEs dos lúpulos, os teores de compostos fenólicos totais foram de 845,98; 1105,43; 1023,70 e 990,95 mg EAG/100 g de massa seca para *Cascade*, *Comet*, *Magnum* e *Zeus*, respectivamente. Essa variação é esperada, uma vez que o acúmulo de compostos fenólicos em *H. lupulus* L. é influenciado por fatores genéticos, pelas condições edafoclimáticas, pelo estágio de maturação dos cones e pelas práticas de cultivo (Knez Hrnčič *et al.*, 2019).

Além dos fatores inerentes de cada cultivar, o método de extração exerce influência direta sobre a recuperação desses metabólitos. A eficiência da extração depende da polaridade do solvente, da temperatura, do tempo de contato e da relação entre solvente e amostra. Embora o etanol seja considerado um solvente seguro e eficiente para a obtenção de compostos bioativos destinados a aplicações farmacêuticas e alimentícias, diferentes condições experimentais podem resultar em rendimentos distintos de compostos fenólicos, dificultando comparações diretas entre estudos (Knez Hrnčič *et al.*, 2019).

Outro aspecto que pode ter contribuído para os resultados obtidos é a composição química característica de cada variedade de lúpulo. No presente trabalho, diferenças também foram observadas na composição dos OEs e nos teores de α - e β -ácidos, indicando que cada cultivar apresenta um metabolismo secundário próprio. Esse

comportamento é consistente com a literatura, que descreve ampla variabilidade química entre variedades de *H. lupulus* L., refletindo diferenças na biossíntese de flavonoides, ácidos fenólicos e compostos prenilados (Stevens; Page, 2004).

Além disso, Calvert *et al.* (2024) demonstraram que o teor de compostos fenólicos em diferentes variedades do lúpulo varia significativamente em função da cultivar, do ano de cultivo e do estágio de desenvolvimento da planta, evidenciando que essas variáveis exercem influência direta sobre a composição fitoquímica. Embora o método de Folin-Ciocalteu seja amplamente utilizado para estimar o conteúdo de compostos fenólicos totais, ele determina a capacidade redutora global da amostra e pode sofrer interferência de outras substâncias redutoras presentes nos extratos (Knez Hrnčič *et al.*, 2019).

5.4 Atividade Antimicrobiana

5.4.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM).

A avaliação do potencial antimicrobiano dos OEs e EEs obtidos a partir das diferentes variedades (*Cascade*, *Comet*, *Zeus* e *Magnum*) demonstrou um espectro de ação variável, sendo fortemente dependente da cepa bacteriana testada e da natureza dos OEs e EEs. Segundo a tabela 8 a determinação da CIM revelou que os compostos apresentam eficácia distinta frente aos patógenos de interesse clínico avaliados.

Os ensaios da CIM revelaram um expressivo potencial inibitório dos OEs avaliados, cujas variações de eficácia guardam estreita relação com as divergências químicas observadas em comparação à literatura. No presente estudo, a variedade *Zeus* destacou-se com a maior potência bacteriostática frente a *S. aureus*, apresentando CIM de 31,25 $\mu\text{g/mL}$. Este resultado assemelha-se ao reportado por Paniagua-García *et al.* (2025), que identificaram a cultivar *Cascade* como a mais ativa contra a mesma cepa, exibindo uma CIM de 30 $\mu\text{g/mL}$.

A convergência na alta eficácia biológica entre diferentes cultivares nesses dois estudos pode ser explicada quimicamente pela abundância de compostos específicos dotados de reconhecida ação antisséptica. Paniagua-García *et al.* (2025) sugerem que o geraniol e o β -farneseno são determinantes para a eficácia antibacteriana do lúpulo. Embora o OE da variedade *Zeus* tenha o maior teor de geraniol (3,21%) entre as amostras avaliadas, não é possível atribuir sua maior atividade antibacteriana a esse constituinte isoladamente. Estudos com os compostos individuais e suas combinações seriam necessários para estabelecer sua contribuição para a atividade observada. De forma

análoga, os OEs dos lúpulos *Cascade* e *Magnum* avaliados nesta pesquisa também demonstraram robusto potencial antimicrobiano, o qual foi sustentado por elevados teores de α -humuleno (26,14% e 25,73%, respectivamente), β -cariofileno (9,53–18,60%) e β -farneseno (11,19% e 9,47%), metabólitos amplamente correlacionados na literatura com a ruptura de membranas bacterianas.

Um achado fundamental deste trabalho, que reforça a complexidade dos mecanismos de ação antimicrobiana, reside no papel do sinergismo molecular. Diferentemente de Paniagua-García *et al.* (2025), que reportaram o mirceno como o constituinte majoritário absoluto (até 64,00%), o presente estudo identificou concentrações significativamente menores deste monoterpene (1,25–18,16%). O fato de os OEs deste estudo manterem (ou superarem) os patamares de atividade biológica da literatura, mesmo na ausência do mirceno como componente principal, indica que a dinâmica de inibição bacteriana decorre da ação conjunta e sinérgica entre os constituintes majoritários e minoritários.

Essa hipótese de sinergismo é robustecida pela identificação inédita, nesta pesquisa, de uma matriz química mais complexa e diversificada, contendo ésteres terpenícos e SO. Como bem discutido por Paniagua-García *et al.* (2025), os compostos isolados individualmente são insuficientes para justificar a magnitude do efeito bactericida, sendo a interação mútua de múltiplos alvos moleculares na célula bacteriana o fator determinante para o sucesso terapêutico do OE.

Os resultados para os OEs evidenciaram um padrão claro de seletividade biológica: os OEs de lúpulo manifestaram alta eficácia contra a bactéria Gram-positiva (*S. aureus*), porém uma marcada redução de atividade frente à Gram-negativa (*P. aeruginosa*). Essa suscetibilidade diferencial é consistente com o panorama descrito por Piasecki, Biernasiuk e Ludwiczuk (2023), que atribuem tal seletividade às barreiras estruturais da parede celular. A intrincada membrana externa das bactérias Gram-negativas, rica em lipopolissacarídeos, atua como uma barreira hidrofílica semipermeável que restringe eficientemente a difusão e a penetração de compostos hidrofóbicos (como os terpenos e sesquiterpenos majoritários do lúpulo), atenuando a efetividade farmacológica do OE sobre esses patógenos.

Para os EEs embora os α -ácidos sejam tradicionalmente reconhecidos como os principais responsáveis pelo amargor da cerveja, diversos estudos demonstram que os β -ácidos apresentam maior atividade antimicrobiana intrínseca, especialmente contra

bactérias Gram-positivas. A maior lipofilicidade da lupulona e de seus derivados favorece sua inserção na membrana citoplasmática bacteriana, promovendo aumento da permeabilidade, dissipação da força próton-motriz, perda de íons essenciais e consequente comprometimento do metabolismo celular. Os α -ácidos também apresentam atividade antimicrobiana, porém geralmente menos pronunciada quando comparados aos β -ácidos na forma não isomerizada (Knez Hrnčič *et al.*, 2019).

Tabela 8. Concentração Inibitória Mínima, em $\mu\text{g/mL}$ dos OEs e EEs dos lúpulos (*Cascade*, *Comet*, *Magnum* e *Zeus*).

		<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Óleo Essencial	<i>Cascade</i>	125,0 $\pm$ 0,6	250,0 $\pm$ 0,2	250,0 $\pm$ 0,2	-
	<i>Comet</i>	500,0 $\pm$ 0,2	-	500,0 $\pm$ 0,5	-
	<i>Magnum</i>	125,0 $\pm$ 0,2	-	125,0 $\pm$ 0,2	-
	<i>Zeus</i>	62,5 $\pm$ 0,2	31,2 $\pm$ 0,2	125,0 $\pm$ 0,5	-
Extrato Etanólico	<i>Cascade</i>	125,0 $\pm$ 0,2	250,0 $\pm$ 0,2	62,5 $\pm$ 0,2	-
	<i>Comet</i>	500,0 $\pm$ 0,3	-	500,0 $\pm$ 0,2	-
	<i>Magnum</i>	125,0 $\pm$ 0,5	-	250,0 $\pm$ 0,3	-
	<i>Zeus</i>	62,5 $\pm$ 0,6	31,2 $\pm$ 0,5	15,6 $\pm$ 0,5	-
Controle Positivo		<15,6	<15,6	<15,6	<15,6

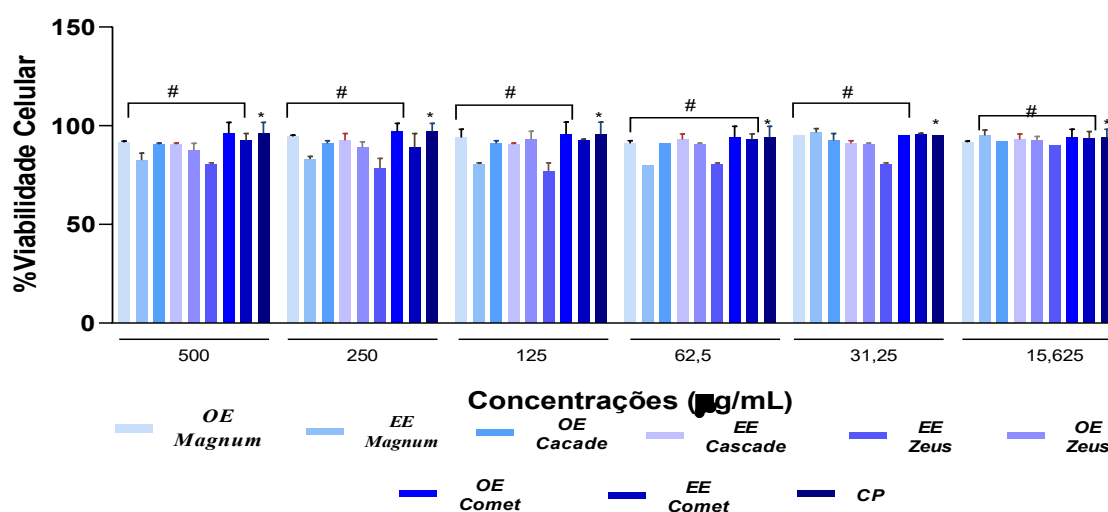
Fonte: Própria autora

A maior suscetibilidade observada para espécies do gênero *Staphylococcus* está de acordo com a literatura, que demonstra que os compostos amargos do lúpulo apresentam maior eficiência contra bactérias Gram-positivas devido à ausência da membrana externa característica das Gram-negativas. Essa estrutura adicional constitui importante barreira física à difusão de compostos hidrofóbicos, limitando a ação antimicrobiana dos α - e β -ácidos em diversas bactérias Gram-negativas. Portanto, os resultados obtidos indicam que diferenças quantitativas na composição de α - e β -ácidos constituem apenas um dos fatores determinantes da atividade antimicrobiana dos EEs de lúpulo, a resposta biológica parece resultar da combinação entre a composição química global de cada cultivar e das características estruturais das bactérias avaliadas (Knez Hrnčič *et al.*, 2019).

5.4.2 Viabilidade Celular

A potencial aplicação de qualquer novo composto bioativo é cancelada por sua segurança para células de mamíferos. A avaliação toxicológica em macrófagos RAW 264,7 confirmou que todas as formulações mantiveram a viabilidade celular superior a 80%, configurando ausência de toxicidade significativa até a concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 14).

Figura 14. Efeito dos OEs e EEs de lúpulo (*Cascade*, *Comet*, *Magnum* e *Zeus*) na viabilidade celular da linhagem de macrófagos RAW 264.7.



Controle positivo (CP): Células sem nenhum tratamento (100%). (Linha preta): percentual acima 80% de viabilidade. Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão. Símbolos diferentes indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao controle positivo ($p < 0,05$).

Fonte: Própria autora

Ao correlacionar a CIM do EE do lúpulo da variedade *Zeus* (15,625 $\mu\text{g/mL}$ para *E. coli* e 31,25 $\mu\text{g/mL}$ para *S. aureus*) com sua inocuidade celular nas mesmas concentrações (e em concentrações mais altas), estabelece-se um excelente Índice Terapêutico (relação entre a dose tóxica e a dose eficaz). Segundo Khaliullina *et al.* (2024), a baixa toxicidade eucariótica de fitocomplexos ricos em terpenos viabiliza seu uso em formulações dermatológicas, enxaguatórios bucais e no recobrimento de dispositivos médicos.

Por fim, para que os achados *in vitro* possam ser aplicados em ensaios clínicos ou no desenvolvimento de bioprodutos exige que os constituintes dos OEs e EEs apresentem um perfil de segurança favorável para as células do hospedeiro. No presente estudo

metodológico, a viabilidade celular foi acautelada com testes em linhas de macrófagos RAW 264.7 utilizando o ensaio de redução do MTT para avaliar eventuais efeitos citotóxicos nas concentrações terapêuticas. Esta abordagem rigorosa vai ao encontro das práticas recomendadas e dos resultados de Di Lodovico *et al.* (2020), que atestaram previamente a biocompatibilidade e a ausência de citotoxicidade do extrato de lúpulo em modelos de *Artemia salina* e em linhas celulares humanas e murinas em todas as concentrações testadas.

5.4.3 Teste de atividade antibiofilme dos OEs e EEs

Além da atividade antibacteriana direta (crescimento planctônico), a capacidade dos microrganismos para formar biofilmes constitui um fator crítico na sua patogenicidade e na tolerância aos agentes antimicrobianos terapêuticos. Neste estudo, o impacto sobre a formação de biofilme foi avaliado na presença de concentrações subinibitórias rigorosas (1/2, 1/5 e 1/10 da CIM) com base no método do cristal violeta (Figuras 15, 16 e 17).

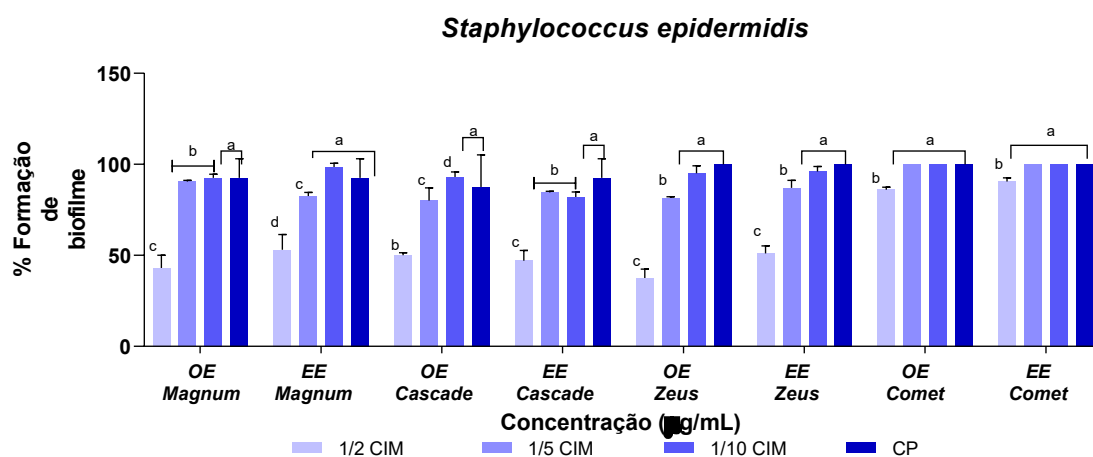
A verificação de inibição da biomassa do biofilme nas estirpes testadas (como demonstrado nas avaliações contra *S. epidermidis*, *S. aureus* e *E. coli*) alinha-se perfeitamente com os achados de Di Lodovico *et al.* (2020), que demonstraram uma redução significativa na formação do biofilme de estafilococos em concentrações reduzidas, até 1/4 da CIM. Esta inibição em concentrações subinibitórias é um dado de extrema relevância, pois sugere que os constituintes do lúpulo podem atuar através de vias mais complexas tais como a modulação dos mecanismos de *quorum sensing* ou a interferência nos mecanismos iniciais de adesão celular e virulência, em vez de causarem simplesmente a lise ou morte celular (Di Lodovico *et al.*, 2020).

Gălăţanu *et al.* (2026) sugerem que constituintes específicos do lúpulo operam com mecanismos complementares, promovendo não apenas ruptura físico-química da matriz extrapolimérica pela alta hidrofobicidade dos sesquiterpenos, mas possivelmente alterando enzimas ligadas à ancoragem celular. O fato de o EE e OE de *Zeus* suprimirem a formação da matriz antes mesmo de desencadearem a morte da bactéria sinaliza o bloqueio de vias fundamentais de *quorum sensing* (comunicação célula-célula) ou a repressão da expressão de adesinas de superfície (Gălăţanu *et al.*, 2026).

Do ponto de vista mecanístico, a literatura aponta que a atuação em concentrações subinibitórias é um indicativo de que os biocompostos não estão apenas exercendo um estresse letal, mas sim atuando como moduladores da expressão gênica relacionada à

formação de biofilme ou interceptadores bioquímicos. Ao reduzir a formação do biofilme de estafilococos em concentrações muito menores que a CIM, postula-se que os derivados avaliados interferem diretamente nos sistemas de *quorum sensing*, inibem a transcrição de genes codificadores de adesinas ou prejudicam a motilidade e adesão inicial. A atividade antibiofilme do OE *Cascade*, EE *Cascade*, OE *Zeus* e EE *Zeus* fortalece a hipótese de seu uso preventivo em superfícies hospitalares ou como adjuvantes terapêuticos para reverter a resistência microbiana (Rozalski *et al.*, 2013).

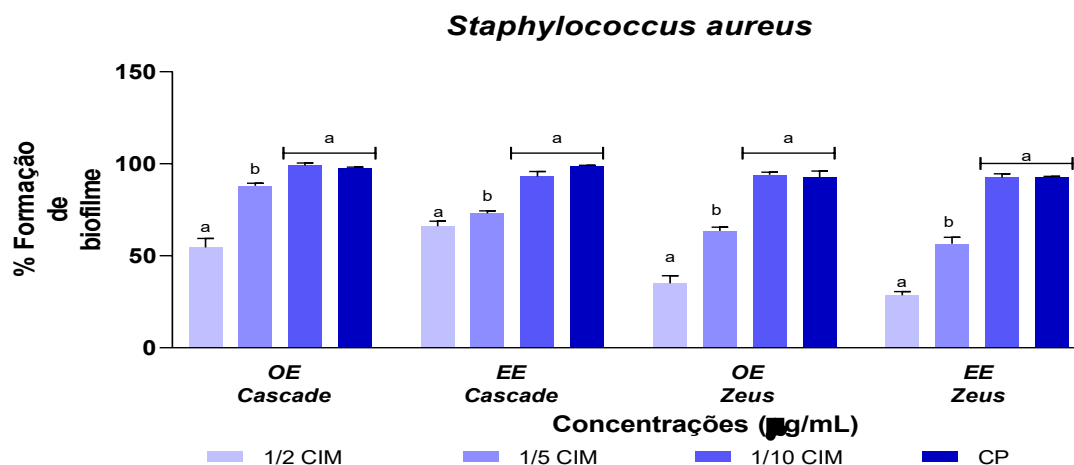
Figura 15. Percentual de inibição da formação de biofilme da cepa *S. epidermidis* após tratamento com os OEs e EEs dos lúpulos (*Cascade*, *Comet*, *Magnum* e *Zeus*).



Controle positivo (CP): bactéria sem tratamento, utilizada para a formação do biofilme. Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao controle positivo ($p < 0,05$).

Fonte: Própria autora

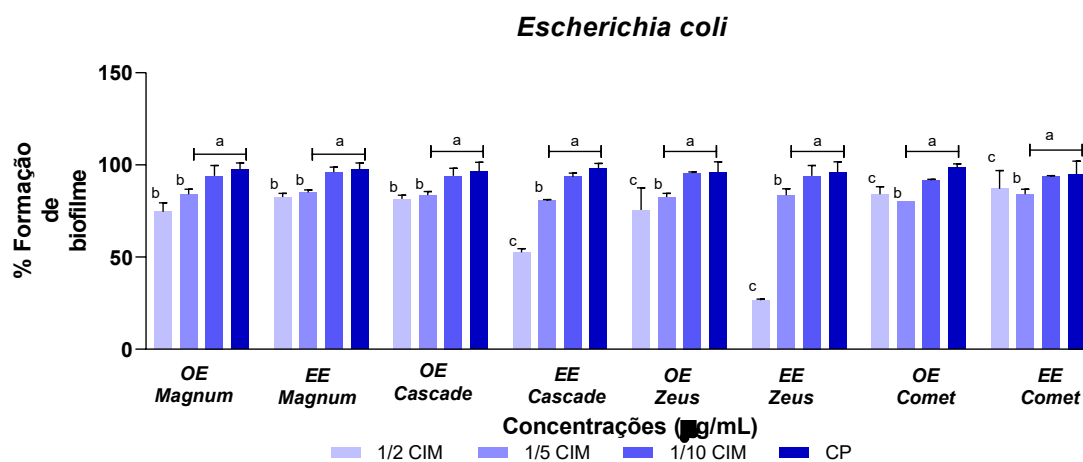
Figura 16. Percentual de inibição da formação de biofilme da cepa *S. aureus* após tratamento com os OEs e EEs dos lúpulos (*Cascade*, *Comet*, *Magnum* e *Zeus*).



Controle positivo (CP): bactéria sem tratamento, utilizada para a formação do biofilme. Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao controle positivo ($p < 0,05$).

Fonte: Própria autora

Figura 17. Percentual de inibição da formação de biofilme da cepa *E. coli* após tratamento com os OEs e EEs dos lúpulos (*Cascade*, *Comet*, *Magnum* e *Zeus*).



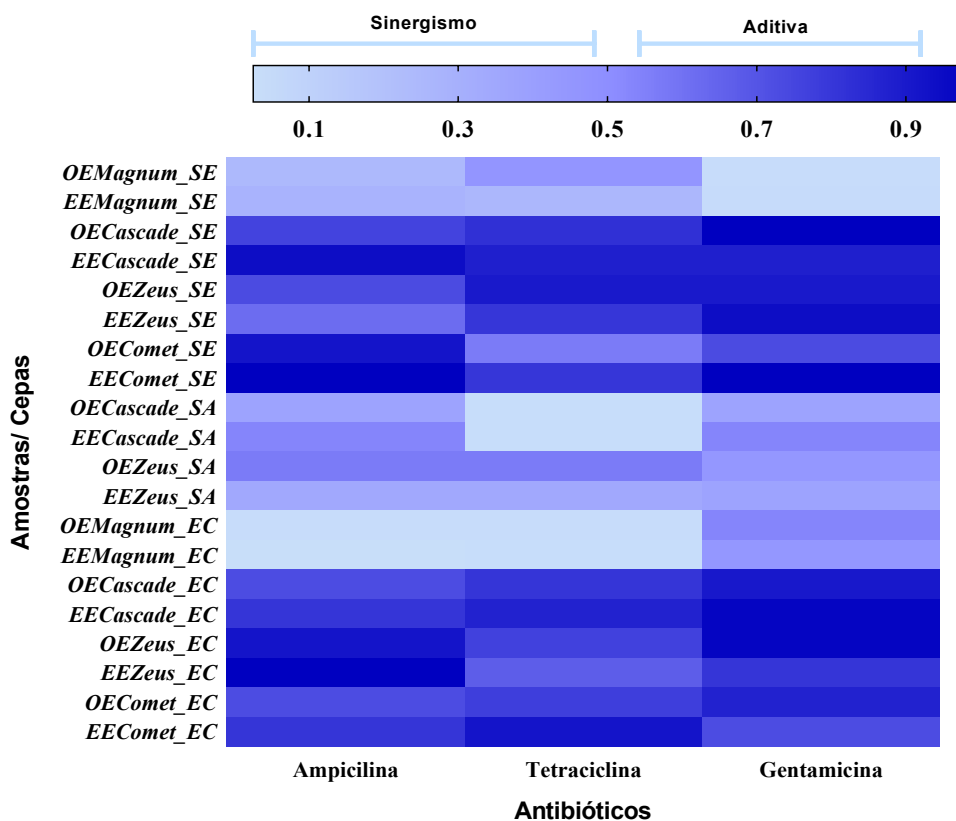
Controle positivo (CP): bactéria sem tratamento, utilizada para a formação do biofilme. Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao controle positivo ($p < 0,05$).

Fonte: Própria autora

5.4.4 Determinação do comportamento da combinação dos OEs e EEs com antibióticos usando ensaio checkerboard

Os ensaios de associação realizados pelo método checkerboard demonstraram que a interação entre os derivados de *H. lupulus* L. e os antibióticos comerciais foi dependente tanto da variedade de lúpulo quanto da espécie bacteriana avaliada (Figura 18). A classificação das interações pelo índice de concentração inibitória fracionária (Σ FIC) evidenciou a predominância de efeitos sinérgicos e aditivos, sem a ocorrência de antagonismo. Segundo Odds (2003), a interpretação do índice Σ FIC permite avaliar a natureza da interação entre dois agentes antimicrobianos, sendo amplamente empregada em estudos que investigam associações entre antibióticos e produtos naturais.

Figura 18. Σ FIC dos OEs e EEs dos lúpulos (*Cascade*, *Comet*, *Magnum* e *Zeus*).



Σ FIC ≤ 0.5 : Interação sinérgica (OEs ou EEs combinados com os antibióticos que potencializam o efeito um do outro). Σ FIC ≤ 1.0 : Interação aditiva ou indiferente (o efeito combinado é semelhante ao efeito individual). Σ FIC > 1.0 : Interação antagonista (o efeito combinado é menor que os efeitos individuais). Cepas: SE (*S. epidermidis*), SA (*S. aureus*) e EC (*E. coli*).

Fonte: Própria autora

Os resultados obtidos demonstraram que a variedade *Magnum* apresentou o maior número de associações sinérgicas, tanto para o OE quanto para o EE, especialmente quando combinados com ampicilina e tetraciclina frente a *S. epidermidis* e *E. coli*. Além disso, foi observado efeito sinérgico entre o OE dessa variedade e a gentamicina contra *S. epidermidis*. Esses achados sugerem que os constituintes químicos presentes nessa variedade podem atuar de forma complementar aos antibióticos avaliados, aumentando a atividade antimicrobiana da associação. Entretanto, como não foram realizados ensaios específicos para determinação do mecanismo de ação, não é possível estabelecer quais constituintes foram responsáveis por esse efeito nem o processo biológico envolvido.

A capacidade dos constituintes derivados de *H. lupulus* L. potencializarem a ação de antibióticos já foi descrita por Natarajan *et al.* (2008), que avaliaram a associação entre xantohumol, lupulona e diferentes antimicrobianos frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, observando efeitos sinérgicos em determinadas combinações. De maneira semelhante, Yap *et al.* (2013) demonstraram que a associação de OEs com antibióticos pode reduzir a resistência bacteriana em cepas multirresistentes portadoras de plasmídeos, evidenciando que metabólitos naturais podem atuar como moduladores da atividade de antimicrobianos convencionais. Esses resultados reforçam a plausibilidade de interações positivas entre os constituintes bioativos do lúpulo e antibióticos, mesmo quando os agentes farmacológicos avaliados diferem daqueles utilizados no presente estudo (Yap *et al.*, 2013).

A variedade *Cascade* também apresentou resultados relevantes, principalmente na associação com tetraciclina frente a *S. aureus*. Embora existam poucos estudos avaliando especificamente o sinergismo entre variedades comerciais de lúpulo e antibióticos, diversos trabalhos demonstram que derivados de *H. lupulus* L. apresentam atividade antimicrobiana contra espécies de *Staphylococcus*. Rozalski *et al.* (2013) demonstraram que produtos derivados do lúpulo reduziram a adesão bacteriana e a formação de biofilmes por *S. aureus* e *S. epidermidis*. A capacidade de interferir na formação de biofilmes é considerada uma característica importante, uma vez que essas estruturas aumentam a tolerância bacteriana aos antimicrobianos e dificultam o tratamento de infecções persistentes (Rozalski *et al.*, 2013).

Em contraste, a variedade *Zeus* apresentou a menor concentração inibitória mínima quando avaliada isoladamente, indicando elevada atividade antimicrobiana intrínseca. No entanto, quando associada aos antibióticos, predominou a ocorrência de

interações classificadas como aditivas. Esse resultado demonstra que uma elevada atividade antimicrobiana individual não implica, necessariamente, maior potencial de sinergismo. Conforme descrito por Odds (2003), efeitos aditivos indicam que ambos os agentes contribuem para a inibição do crescimento bacteriano, porém sem potencialização suficiente para caracterizar interação sinérgica.

Outro aspecto relevante observado foi a ausência de interações antagônicas entre os derivados de *H. lupulus* L. e os antibióticos avaliados. Esse resultado possui importância farmacológica, pois demonstra que os produtos naturais não reduziram a atividade dos antimicrobianos empregados. A inexistência de antagonismo é considerada um requisito importante para o desenvolvimento de terapias combinadas, uma vez que indica compatibilidade entre os constituintes associados e reduz a possibilidade de interferência negativa na eficácia do tratamento (Odds, 2003). Entretanto, considerando a escassez de estudos envolvendo diferentes variedades comerciais de lúpulo, novas investigações são necessárias para identificar os constituintes responsáveis pelas interações observadas, esclarecer seus mecanismos de ação e avaliar a eficácia dessas associações em modelos experimentais e isolados clínicos resistentes.

5.4.5 Atividade Antiviral

O vírus Mayaro é um arbovírus da família *Togaviridae*, parente próximo do causador da chikungunya, e provoca uma doença infecciosa aguda com quadro clínico bastante semelhante, caracterizado por febre alta, cefaleia, exantema (manchas vermelhas) e, principalmente, fortes dores nas articulações que podem persistir por meses (Esposito; Fonseca *et al.*, 2017). Transmitido predominantemente por mosquitos silvestres do gênero *Haemagogus*, o vírus circula historicamente em regiões de mata da Bacia Amazônica e do Centro-Oeste brasileiro, mantendo um ciclo silvestre onde os primatas não-humanos atuam como hospedeiros primários (Coimbra *et al.*, 2007).

Embora o ser humano seja um hospedeiro acidental, infectando-se ao adentrar essas áreas florestais, há uma preocupação constante da comunidade científica quanto a uma possível urbanização do vírus. Estudos de competência vetorial demonstram que mosquitos urbanos, como o *Aedes aegypti*, têm capacidade biológica de se infectar e transmitir o Mayaro, o que representaria um risco de disseminação em larga escala pelo país (Long *et al.*, 2011).

Os resultados obtidos demonstraram que os EEs apresentaram valores de Concentração Citotóxica 50% (CC₅₀) superiores aos observados para os respectivos OEs,

indicando menor citotoxicidade sobre as células Vero. Entre os EEs, o cultivar *Cascade* apresentou a maior CC₅₀ (0,1728% v/v), seguido por *Comet* (0,1147% v/v), *Magnum* (0,0915% v/v) e *Zeus* (0,0849% v/v), enquanto os OEs exibiram valores inferiores entre 0,0185 e 0,0465% (v/v) (Tabela 9).

Tais distinções biológicas podem ser atribuídas às variações no perfil químico dos OEs, particularmente no que concerne à proporção entre monoterpenos e sesquiterpenos. A análise cromatográfica revelou que o OE do lúpulo da variedade *Comet* (mais tóxico) concentrou o maior teor de MH (18,16%). Em contrapartida, o OE do lúpulo da variedade *Magnum* (menos tóxico) destacou-se por uma expressiva proporção de SH (70,03%).

A citotoxicidade dos OEs está diretamente relacionada ao seu elevado caráter lipofílico, característica que favorece a interação de seus constituintes com as membranas biológicas (Figura 19). De acordo com a literatura, os terpenos difundem-se facilmente através da bicamada fosfolipídica, promovendo alterações na fluidez e na permeabilidade da membrana plasmática. Essas alterações comprometem a integridade celular, resultando na perda da homeostase, disfunção mitocondrial e consequente redução da viabilidade celular. Os autores destacam ainda que a atividade citotóxica dos OEs não pode ser atribuída exclusivamente a um único constituinte, sendo resultado da ação sinérgica e aditiva entre os diversos constituintes presentes na mistura complexa (Dhifi *et al.*, 2016).

De forma complementar, estudos descrevem que os OEs como misturas complexas constituídas principalmente por terpenos e fenilpropanoides, capazes de atuar simultaneamente sobre múltiplos alvos celulares. Segundo os autores, a elevada lipofilicidade dessas moléculas favorece sua incorporação à membrana citoplasmática, promovendo aumento da permeabilidade, desorganização da bicamada lipídica, desequilíbrio iônico e comprometimento do transporte de elétrons. Esses eventos desencadeiam alterações no metabolismo celular, comprometem a função mitocondrial e podem culminar em morte celular por necrose ou apoptose, especialmente em concentrações mais elevadas. Dessa forma, a citotoxicidade observada para os OEs decorre da ação integrada de seus constituintes, e não da atividade isolada de um único composto (Raut; Karuppayil, 2014).

Nesta perspectiva, a maior citotoxicidade (menor valor de CC₅₀) constatada para o OE de lúpulo da variedade *Comet* pode estar diretamente associada à expressiva concentração de MH em sua composição. Estudos destacam o acetato de geranila, o

linalol e o geraniol presentes em maiores porcentagens de área no OE da variedade *Zeus*, descritos na literatura como moléculas altamente lipofílicas e capazes de promover intensa interação com as membranas biológicas. Em oposição, o OE de lúpulo da variedade *Magnum*, que denotou o maior valor de CC₅₀ (menor toxicidade), caracteriza-se pelo predomínio de SH notadamente o α -humuleno (25,73%), o *E*-cariofileno (15,13%) e o *E*- β -farneseno (9,47%), combinados a uma reduzida proporção de constituintes oxigenados (Dhifi *et al.*, 2016).

Neste contexto, mesmo que compostos como o *E*-cariofileno e o α -humuleno sejam amplamente reconhecidos por suas relevantes atividades biológicas o que inclui propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e antiproliferativas em modelos experimentais específicos, estas moléculas não são consideradas as principais determinantes da citotoxicidade dos OEs quando avaliadas de forma isolada. Evidências apontam, por exemplo, que o *E*-cariofileno exibe baixa citotoxicidade em sua forma purificada, indicando que seus efeitos biológicos dependem intrinsecamente da interação com os demais componentes presentes na matriz complexa do OE (Sotto *et al.*, 2020).

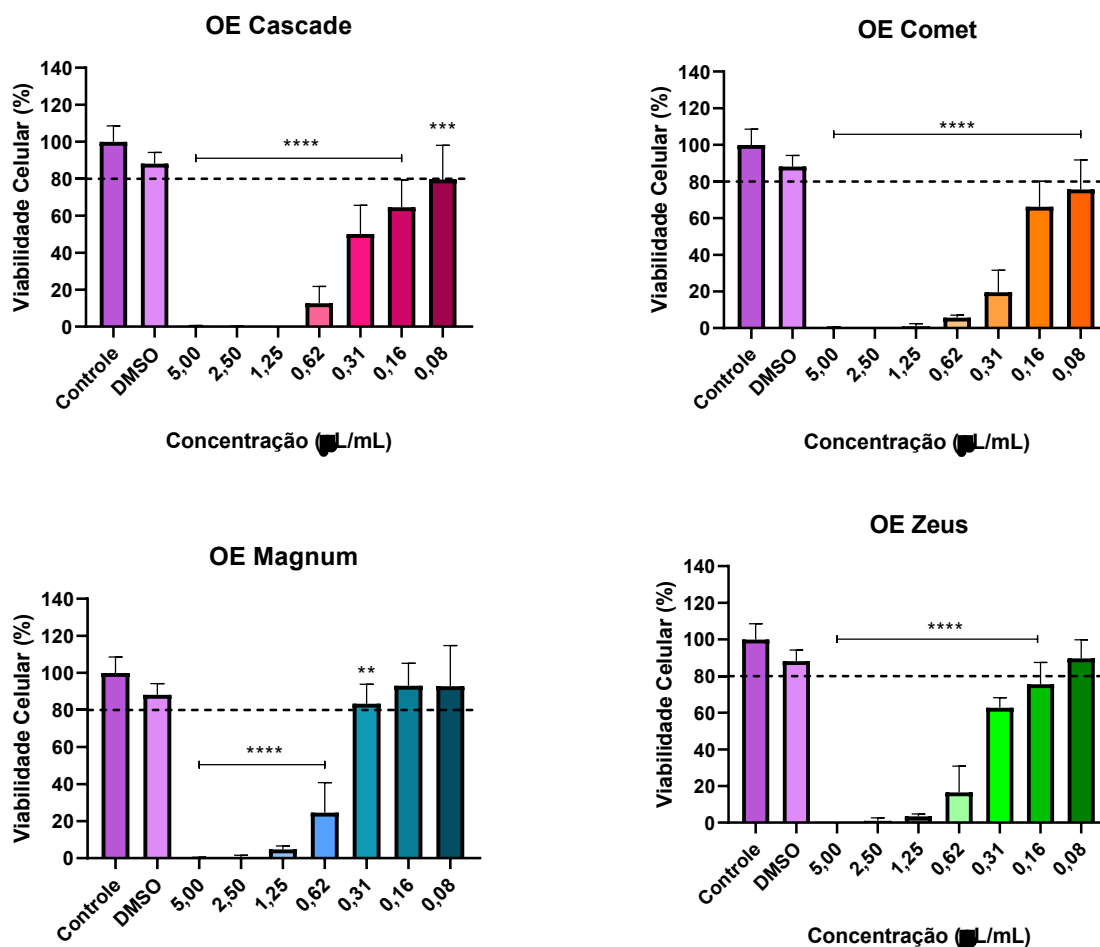
Diante do exposto, os resultados obtidos sugerem que a menor citotoxicidade inerente ao OE do lúpulo da variedade *Magnum* se relaciona, substancialmente, à predominância de SH e ao déficit relativo de MO. Inversamente, a maior toxicidade verificada para os OEs dos lúpulos *Cascade*, *Comet* e *Zeus* deriva, de modo provável, da composição global desses OEs, impulsionada pela maior contribuição de compostos oxigenados e pelo sinergismo entre os diferentes terpenos.

Tabela 9. Concentração citotóxica em célula Vero dos OEs e EEs dos lúpulos (*Cascade*, *Comet*, *Magnum* e *Zeus*).

Variedade	EEs (% v/v)		OEs (% v/v)	
	CC ₅₀	CC ₂₀ (Trabalho)	CC ₅₀	CC ₂₀ (Trabalho)
<i>Cascade</i>	0,1728	0,0620	0,0244	0,0080
<i>Comet</i>	0,1147	0,0620	0,0185	0,0080
<i>Magnum</i>	0,0915	0,0310	0,0465	0,0310
<i>Zeus</i>	0,0849	0,0310	0,0329	0,0080

Fonte: Própria autora

Figura 19. Citotoxicidade em célula Vero dos OEs dos lúpulos (*Cascade*, *Comet*, *Magnum* e *Zeus*).



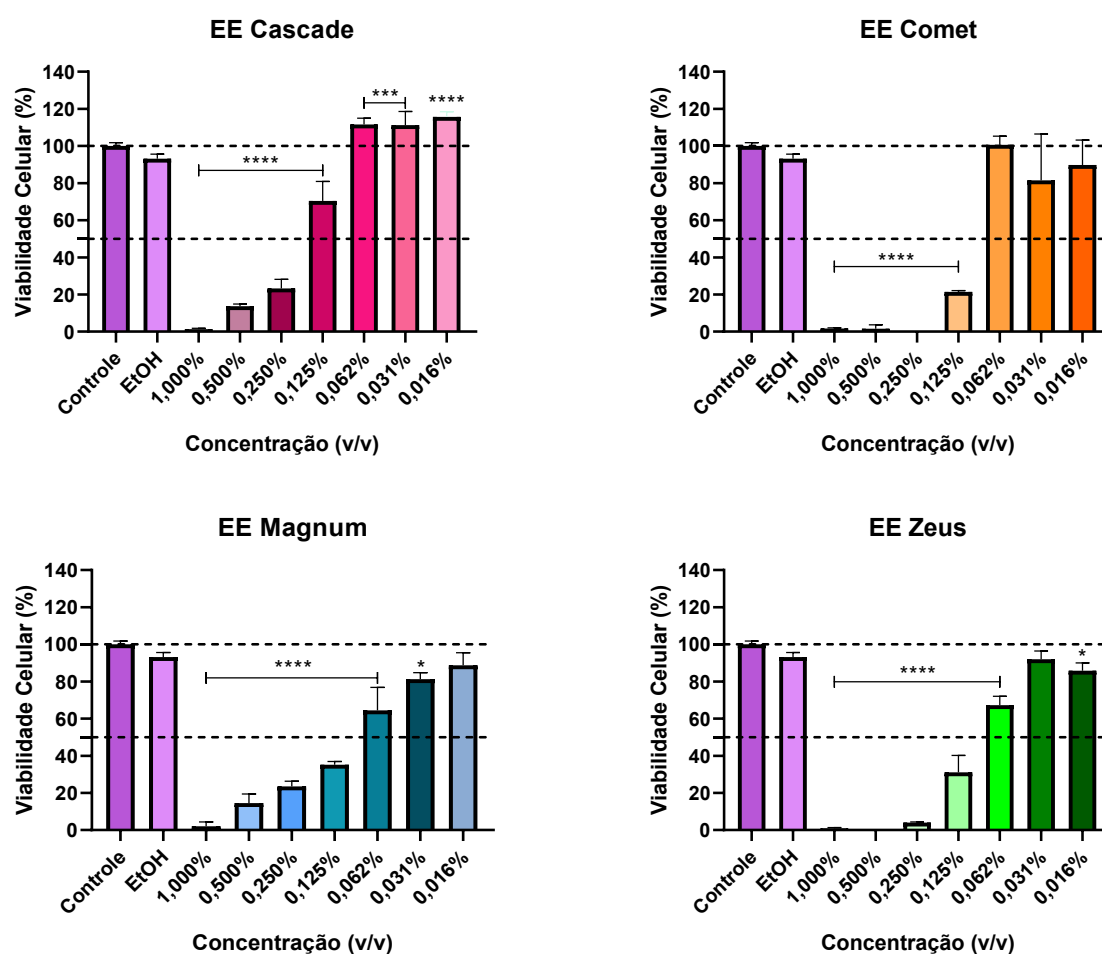
Fonte: Própria autora

Em contrapartida, os EEs apresentam composição química mais complexa, contendo não apenas α - e β -ácidos, mas também compostos fenólicos, flavonoides prenilados e outros metabólitos secundários menos voláteis (Figura 20). Essa diversidade química pode reduzir os efeitos deletérios provocados por compostos isolados, favorecendo uma resposta celular menos tóxica. Entre esses metabólitos, destaca-se o xantohumol, considerada um dos principais prenilflavonoides do lúpulo, cuja baixa toxicidade em células de mamíferos tem sido demonstrada em diferentes modelos experimentais, além de apresentar propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antivirais (Stevens; Page, 2004; Knez Hrnič *et al.*, 2019).

Outro aspecto relevante é que os teores de α - e β -ácidos determinados nos EEs apresentaram variações entre os cultivares, podendo contribuir para diferenças na

resposta biológica observada. Os α -ácidos (humulonas) e β -ácidos (lupulonas) possuem reconhecida atividade antimicrobiana e têm sido associados também à inibição da replicação de alguns vírus envelopados. Entretanto, esses compostos apresentam caráter anfifílico, podendo interagir com membranas celulares quando utilizados em concentrações elevadas. Assim, concentrações moderadas podem favorecer a atividade antiviral, enquanto concentrações excessivas tendem a aumentar a citotoxicidade, reforçando a importância da determinação prévia dos valores de CC_{20} e CC_{50} para seleção das concentrações empregadas nos ensaios antivirais (Knez Hrnčič *et al.*, 2019). Diante disso pode-se concluir que o EE de lúpulo menos tóxico foi o *Cascade* e o EE de lúpulo mais tóxico foi o *Zeus*.

Figura 20. Citotoxicidade em célula Vero dos EEs dos lúpulos (*Cascade*, *Comet*, *Magnum* e *Zeus*).



Fonte: Própria autora

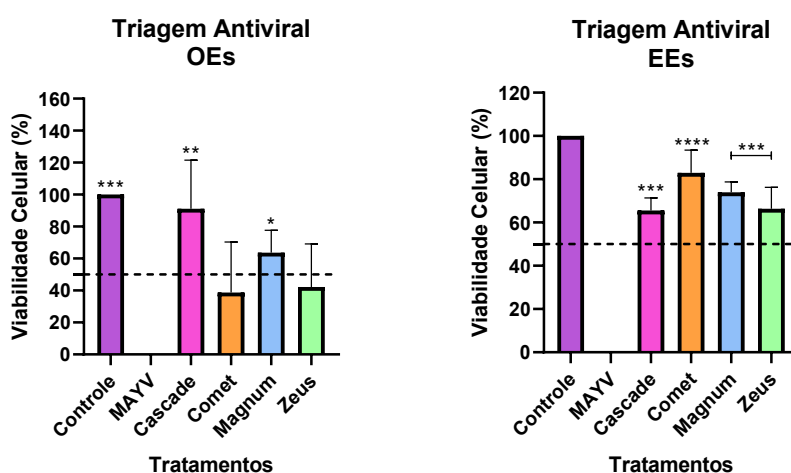
A triagem antiviral (Figura 21) demonstrou diferenças importantes entre os OEs e EEs dos lúpulos, evidenciando que a atividade antiviral não depende exclusivamente da presença de compostos bioativos, mas também da concentração em que estes podem ser utilizados sem causar danos às células hospedeiras. De maneira geral, os EEs apresentaram menor citotoxicidade quando comparados aos OEs, permitindo sua avaliação em concentrações mais elevadas durante os ensaios antivirais. Esse comportamento pode ser atribuído à composição química dos EEs, que contém uma mistura de α -ácidos, β -ácidos, flavonoides prenilados, como o xantohumol, e outros compostos fenólicos, enquanto os OEs são constituídos predominantemente por monoterpenos e sesquiterpenos altamente lipofílicos. Esses terpenos, embora apresentem reconhecida atividade antimicrobiana e antiviral, podem promover alterações na permeabilidade da membrana plasmática e desencadear efeitos citotóxicos em concentrações elevadas, reduzindo a janela terapêutica disponível para avaliação antiviral.

Por outro lado, compostos fenólicos presentes nos EEs apresentam, em geral, menor toxicidade celular e são capazes de exercer atividade antiviral por diferentes mecanismos, incluindo a inibição da adsorção viral, interferência na replicação e modulação da resposta oxidativa celular. Assim, a observação de maior segurança dos EEs em relação aos OEs representa um aspecto relevante para o desenvolvimento de agentes antivirais de origem natural, uma vez que a eficácia terapêutica depende do equilíbrio entre elevada atividade antiviral e baixa citotoxicidade, refletido em um maior índice de seletividade. Adicionalmente, o maior rendimento de obtenção dos EEs em relação aos OEs representa uma vantagem do ponto de vista de aproveitamento da matéria-prima, podendo tornar sua produção mais viável e ampliar as perspectivas de aplicação desses extratos (Stevens; Page, 2004; Knez Hrnčič *et al.*, 2019; Almaguer *et al.*, 2014).

Nesse contexto, o OE de lúpulo da variedade *Magnum* destacou-se por apresentar o maior CC₂₀ entre os OEs (0,0310% v/v), possibilitando sua avaliação em concentrações superiores às dos demais OEs, porém esse parâmetro (maior CC₂₀) não se refletiu diretamente na maior atividade antiviral, observada para o OE do lúpulo da variedade *Cascade*. Isso evidencia que a eficácia antiviral depende não apenas da segurança de uso, mas também da composição química específica de cada extrato e dos mecanismos de ação de seus metabólitos bioativos.

Os EEs de lúpulos *Cascade* e *Comet* apresentaram os maiores valores de CC₂₀ (0,062% v/v), permitindo sua avaliação em concentrações superiores às dos EEs de lúpulos *Magnum* e *Zeus*. Entretanto, apenas o EE de lúpulo da variedade *Comet* apresentou elevada atividade antiviral na triagem, enquanto o EE de lúpulo da variedade *Cascade* exibiu menor capacidade de reduzir a infecção viral. Esses resultados indicam que o CC₂₀ representa um parâmetro de segurança experimental, mas não determina, isoladamente, a eficácia antiviral. Assim, a maior atividade observada para os EEs de lúpulos *Comet*, *Magnum* e *Zeus* provavelmente está relacionada às diferenças na composição química e na interação entre seus metabólitos bioativos, e não apenas à possibilidade de utilização em concentrações mais elevadas.

Figura 21. Triagem Antiviral dos OEs e EEs (*Cascade*, *Comet*, *Magnum* e *Zeus*) frente ao vírus Mayaro.



Fonte: Própria autora

6 Conclusão

Os resultados obtidos demonstram que as variedades de lúpulo *Cascade*, *Comet*, *Magnum* e *Zeus*, cultivadas na Zona da Mata Mineira, apresentam composição química compatível com a descrita para lúpulos comerciais, evidenciando o potencial de adaptação da cultura às condições edafoclimáticas brasileiras. A caracterização dos OEs revelou diferenças qualitativas e quantitativas entre as variedades, destacando-se o OE da variedade *Zeus*, que apresentou composição química distinta das demais, conforme evidenciado pela análise de componentes principais (PCA). Da mesma forma, a quantificação dos α - e β -ácidos e dos compostos fenólicos totais revelou variações entre

as variedades, demonstrando a influência do genótipo sobre a composição química dos *pellets* e dos EEs.

Os ensaios biológicos evidenciaram o potencial dos OEs e EEs como fontes de compostos bioativos. Os OEs e EEs não foram tóxicos para células de macrófagos, destacando-se o OE da variedade *Zeus*, apresentando a menor CIM e expressiva capacidade de inibição da formação de biofilme contra *S. epidermidis* e *S. aureus*. De modo semelhante, o EE da variedade *Zeus* apresentou a menor CIM contra *S. epidermidis*, *S. aureus* e *E. coli*, além de expressiva capacidade de inibição da formação de biofilme de *S. aureus* e *E. coli*. Por sua vez, o OE da variedade *Magnum* apresentou os melhores resultados nos ensaios de combinação com antibióticos, evidenciando o potencial dessas associações para estudos voltados ao desenvolvimento de estratégias antimicrobianas combinadas.

Além da atividade antibacteriana, os OEs e EEs apresentaram atividade antiviral contra o vírus Mayaro em concentrações não citotóxicas para células Vero, ampliando as perspectivas de investigação desses produtos naturais como potenciais agentes antivirais. Embora o OE da variedade *Magnum* tenha apresentado o maior valor de CC₂₀, esse parâmetro não esteve diretamente relacionado à eficácia antiviral, uma vez que o OE da variedade *Cascade* apresentou a maior atividade contra o vírus Mayaro. Comportamento semelhante foi observado para os EEs, visto que maiores valores de CC₂₀ não corresponderam necessariamente a uma maior eficácia antiviral, destacando-se o EE da variedade *Comet* como o mais ativo. Esses resultados indicam que a atividade antiviral não depende apenas da concentração não citotóxica empregada, mas também da composição química de cada OE ou EE.

Em conjunto, os resultados demonstram que os lúpulos produzidos na Zona da Mata Mineira constituem uma fonte relevante de metabólitos secundários de interesse tecnológico e farmacológico. Dessa forma, o aproveitamento dos OEs e EEs avaliados neste trabalho representa uma alternativa promissora para agregar valor à cadeia produtiva do lúpulo no Brasil, ampliando suas possibilidades de aplicação para além da indústria cervejeira, especialmente nos setores farmacêutico, alimentício e biotecnológico. Adicionalmente, o maior rendimento de obtenção dos EEs em relação aos OEs representa uma vantagem do ponto de vista do aproveitamento da matéria-prima, podendo tornar sua produção mais viável e ampliar as perspectivas de aplicação desses extratos. Estudos futuros envolvendo o isolamento e a identificação dos compostos

responsáveis pelas atividades observadas, a elucidação de seus mecanismos de ação e avaliações *in vivo* poderão contribuir para a consolidação dessas aplicações e para o desenvolvimento de novos produtos de origem natural.

Declaração de uso de ferramentas de Inteligência Artificial

Durante a elaboração desta dissertação, foram utilizadas ferramentas de inteligência artificial generativa, especificamente ChatGPT (OpenAI) e Gemini Pro (Google), exclusivamente como recursos auxiliares para revisão gramatical, aprimoramento da clareza e fluidez textual e apoio à tradução de trechos entre os idiomas português e inglês. Todas as sugestões fornecidas por essas ferramentas foram analisadas criticamente pela autora antes de sua eventual incorporação ao texto. As ferramentas de inteligência artificial não foram utilizadas para geração, análise ou interpretação de dados experimentais, elaboração de resultados ou definição das conclusões científicas deste trabalho. A autora assume integral responsabilidade pelo conteúdo, pela precisão das informações e pela versão final da dissertação.

7 Referências

- [1] Abiko, Y.; Paudel, D.; Uehara, O. Hop components and oral health. **Journal of Functional Foods**, v. 92, art. 105035, 2022.
- [2] Abram, V.; Ceh, B.; Vidmar, M.; Hercezi, M.; Lazic, N.; Bucik, V.; Kosir, I. J. A comparison of antioxidant and antimicrobial activity between hop leaves and hop cones. **Industrial Crops and Products**, v. 64, p. 124–134, 2015.
- [3] Adams, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. 4. ed. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 2017.
- [4] Agência Estadual de Notícias. Com pesquisa e iniciativas pioneiras, Paraná pode se tornar a terra do lúpulo no futuro. AEN, Araucária, 05 mar. 2024. Disponível em: <https://www.parana.pr.gov.br/aen/Noticia/Com-pesquisa-e-iniciativas-pioneiras-Parana-pode-se-tornar-terra-do-lupulo-no-futuro>. Acesso em: 25 nov. 2025.
- [5] Almaguer, C.; Schonberger, C.; Gastl, M.; Aron, P.; Becker, T. *Humulus lupulus* — A story that begs to be told. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 127, p. 7–19, 2014.
- [6] Almeida, A. R.; Conto, C. L. Lúpulo no Brasil: Uma cultura promissora em ascensão. **Food Science Today**, v. 3, p. 1–6, 2024.
- [7] Almeida, A. R.; Maciel, M. V. O. B.; Gandolpho, B. C. G.; Machado, M. H.; Teixeira, G. L.; Bertoldi, F. C.; Noronha, C. M.; Vitali, L.; Block, J. M.; Barreto, P. L. M. Brazilian grown Cascade hop (*Humulus lupulus* L.): LC-ESI-MS-MS and GC-MS analysis of chemical composition and antioxidant activity of extracts and essential oils. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 79, p. 156–166, 2020.
- [8] AMERICAN SOCIETY OF BREWING CHEMISTS (ASBC). **Methods of analysis: Hops-14 - α - and β -acids in hops and hop extracts by HPLC**. St. Paul: ASBC, 2021. Disponível em: <https://www.asbcnet.org/Methods/HopsMethods/Pages/default.aspx>. Acesso em: 17 maio 2026.
- [9] Arolúpulo, 2023. **Associação Brasileira dos Produtores de Lúpulo**. Dados e estatísticas 2023. Disponível: <https://www.aprolupulo.com.br/>. Acesso: 25 de novembro.
- [10] Araldi, B. L.; Sato, J. A.; Moreno, G.; Roberto R. S. Aspectos agrônômicos de variedades de Lúpulo conduzidas com suplementação artificial do fotoperíodo em regiões subtropicais. **Revista Thêma et Scientia**, v. 14, p. 76–95, 2024.
- [11] Arruda, T. R.; Pinheiro, P. F.; Silva, P. I.; Bernardes, P. C. A new perspective of a well-recognized raw material: Phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities and α - and β -acids profile of Brazilian hop (*Humulus lupulus* L.) extracts. **Food Science and Technology**, v. 141, art. 110905, 2021.

- [12] Baker, G. A.; Danenhower, T. M.; Force, L. J.; Petersen, K. J.; Betts, T. A. HPLC Analysis of α - and β -Acids in Hops. **Journal of Chemical Education**, v. 85, art. 954, 2008.
- [13] Bamforth, C. W. **Beer: tap into the art and science of brewing**. 3. ed. Nova York: Oxford University Press, 2011.
- [14] Barthhaas; John I. Haas. **The BarthHaas Report 2023/2024: Developments in the Hop Market**. Nuremberg: BarthHaas GmbH & Co. KG, 2024. Disponível em: <https://www.barthhaas.com/company/news/news-article/bh/barthhaas-report-2023-2024>. Acesso em: 10 nov. 2025.
- [15] Barthhaas; John I. Haas. **The BarthHaas Report 2024/2025: Developments in the Hop Market**. Nuremberg: BarthHaas GmbH & Co. KG, 2024. Disponível em: <https://www.barthhaas.com/company/news/news-article/bh/barthhaas-report-2024-2025-on-the-2024-hop-harvest>. Acesso em: 10 nov. 2025.
- [16] Bassolé, I. H. N.; Julien, S. H. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. **Molecules**, v. 17, p. 3989–4006, 2012.
- [17] Behr, J.; Vogel, RF. Mechanisms of hop inhibition include the transmembrane redox reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 142–149, 2010.
- [18] Behre, K. E. The history of beer additives in Europe — a review. **Vegetation History and Archaeobotany**, v. 8, p. 35–48, 1999.
- [19] Bellio, P.; Fagnani, L.; Nazzicone, L.; Celenza, G. New and simplified method for drug combination studies by checkerboard assay. **MethodsX**, v. 8, art. 101543, 2021.
- [20] Biendl, M.; Pinzl, C. **Arzneipflanze Hopfen: Anwendungen-Wirkungen-Geschichte**; Deutsches Hopfenmuseum: Wolnzach, Alemanha, 2007.
- [21] Blanquer-Rosselló, M. M.; Oliver, J.; Valle, A.; Roca, P. Effect of xanthohumol and 8-prenylnaringenin on oxidative stress and mitochondrial complexes expression in MCF-7 breast cancer cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 114, p. 2785–2794, 2013.
- [22] Blaxland, J.; Thomas, R.; Baillie, L. The antibacterial effect of *Humulus lupulus* (hops) against *Mycobacterium bovis* BCG: a promising alternative in the fight against bovine tuberculosis? **Beverages**, v. 8, art. 43, 2022.
- [23] Bocquet, L.; Rivière, C.; Dermont, C.; Samaillie, J.; Hilbert, JL; Halama, P.; Siah, A.; Sahpaz, S. Antifungal activity of hop extracts and compounds against the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. **Industrial Crops and Products**, v. 122, p. 290–297, 2018.
- [24] Bocquet, L.; Sahpaz, S.; Rivière, C. An overview of the antimicrobial properties of hops. In: MÉRILLON, J.-M.; RIVIÈRE, C. (org.). Natural antimicrobial agents. **Springer International Publishing**, p. 31–54, 2018.

- [25] Bolton, J. L.; Dunlap, T. L.; Hajirahimkhan, A.; Mbachu, O.; Chen, S. N.; Chadwick, L.; Nikolic, D.; Van Breemen, R. B.; Pauli, G. F.; Dietz, B. M. The multiple biological targets of hops and bioactive compounds. **Chemical Research in Toxicology**, v. 32, p. 222–233, 2019.
- [26] Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Lúpulo no Brasil: Perspectivas e realidades**. Brasília: MAPA, 2022.
- [27] Caboclo, R. M. F.; Cavalcante, F. S.; Iorio, N. L. P.; Schuenck, R. P.; Olendzki, A. N.; Felix, M. J.; Chamon, R. C.; dos Santos, K. R. N. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Rio de Janeiro hospitals: Dissemination of the USA400/ST1 and USA800/ST5 SCCmec type IV and USA100/ST5 SCCmec type II lineages in a public institution and polyclonal presence in a private one. **American Journal of Infection Control**, v. 41, p. 21–26, 2013.
- [28] Calvert, D.; Dew, T.; Gadon, A.; Gros, J.; Cook, D. Valorisation of hop leaves for their bioactive compounds: Identification and quantification of phenolics across different varieties, crop years and stages of development. **Food Chemistry**, v. 465, pt. 2, art. 142005, 2024.
- [29] Carbone, K.; Gervasi, F. An updated review of the genus *Humulus*: a valuable source of bioactive compounds for health and disease prevention. **Plants**, v. 11, art. 3434, 2022.
- [30] Cermak, P.; Olsovska, J.; Mikyska, A.; Dusek, M.; Kadleckova, Z.; Vanicek, J.; Nyc, O.; Sigler, K.; Bostikova, V.; Bostik, P. Strong antimicrobial activity of xanthohumol and other derivatives from hops (*Humulus lupulus* L.) on gut anaerobic bacteria. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 125, p. 1033–1038, 2017.
- [31] Clark, S. M.; Vaitheeswaran, V.; Ambrose, S. J.; Purves, R. W.; Page, J. E. Transcriptome analysis of bitter acid biosynthesis and precursor pathways in hop (*Humulus lupulus*). **BMC Plant Biology**, v. 13, art. 12, 2013.
- [32] Coimbra, T. L. M.; Santos, C. L. S.; Suzuki, A.; Petrella, S. M. C.; Bisordi, I.; Nagamori, A. H.; Marti, A. T.; Santos, R. N.; Fialho, D. M.; Lavigne, S.; Buzzar, M. R.; Rocco, I. M. Mayaro virus: imported cases of human infection in São Paulo State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, p. 221–224, 2007.
- [33] Dekeukeleire, J.; Ooms, G.; Heyerick, A.; Roldan-Ruiz, I.; Van Bockstaele, E.; Dekeukeleire, D. Formation and accumulation of α -acids, β -acids, desmethyloxanthohumol, and xanthohumol during flowering of hops (*Humulus lupulus* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 15, p. 4436–4441, 2003.
- [34] Di Lodovico, S.; Menghini, L.; Ferrante, C.; Recchia, E.; Castro-Amorim, J.; Gameiro, P.; Cellini, L.; Bessa, L. J. Hop extract: an effective antimicrobial and antibiofilm agent against multidrug-resistant staphylococci strains and *Cutibacterium acnes*. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, art. 1852, 2020.

- [35] Di Sotto, A.; Checconi, P.; Celestino, I.; Locatelli, M.; Carissimi, S.; De Angelis, M.; Rossi, V.; Limongi, D.; Toniolo, C.; Martinoli, L.; e outros. Antiviral and antioxidant activity of a hydroalcoholic extract from *Humulus lupulus* L. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, art. 5919237, 2018.
- [36] Di Sotto, A.; Mancinelli, R.; Gulli, M.; Eufemi, M.; Mammola, C. L.; Mazzanti, G.; Di Giacomo, S. Chemopreventive Potential of Caryophyllane Sesquiterpenes: An Overview of Preliminary Evidence. **Cancers**, v. 12, n. 10, p. 3034, 2020.
- [37] Dhifi, W.; Bellili, S.; Jazi, S.; Bahloul, N.; Mnif, W. Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. **Medicines**, v. 3, n. 4, art. 25, 2016.
- [38] Duarte, P. F.; Do Nascimento, L. H.; Fischer, B.; Lohmann, A. M.; Bandeira, V. J.; Fernandes, I. A.; Da Magro, J.; Valduga, E.; Cansian, R. L.; Paroul, N.; Junges, A. Effect of Extraction Time on the Yield, Chemical Composition, and Antibacterial Activity of Hop Essential Oil Against Lactic Acid Bacteria (*Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus casei*) Beer Spoilage. **Current Microbiology**, v. 80, art. 237, 2023.
- [39] EMBRAPA. **Rede científica pretende estabelecer sistemas de produção de lúpulo no Brasil**. Portal Embrapa, 14 fev. 2023. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/78342634/rede-cientifica-pretende-estabelecer-sistemas-de-producao-de-lupulo-no-brasil>. Acesso em: 25 nov. 2025.
- [40] Esposito, D. L. A.; Fonseca, B. A. L. Will Mayaro virus be responsible for the next outbreak of an arthropod-borne virus in Brazil? **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 21, n. 5, p. 540-544, 2017.
- [41] EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING (EUCAST). **EUCAST**. Disponível em: <https://www.eucast.org/>. Acesso em: 30 jun. 2026.
- [42] Fahle, A.; Bereswill, S.; Heimesaat, MM. Antibacterial effects of biologically active ingredients in hops provide promising options to combat infections with pathogenic bacteria including multidrug resistant species. **European Journal of Microbiology and Immunology**, v. 12, p. 22–30, 2022.
- [43] Farag, M. A.; Porzel, A.; Schmidt, J.; Wessejohann, L. A. Metabolite profiling and fingerprinting of commercial cultivars of *Humulus lupulus* L. (hop): a comparison of MS and NMR methods in metabolomics. **Metabolomics**, v. 8, p. 492-507, 2012.
- [44] FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **FAOSTAT Statistical Database: Crops – Hops (Humulus lupulus)**. Rome: FAO, 2023. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>. Acesso em: 10 nov. 2025.
- [45] Galatanu, M. L.; Panturoiu, M.; Ordeanu, V.; Neagu, R.; Gavriloiu, R. M.; Aurica, S. N.; Costache, G. M. Revealing the Bioactive Potential of Romanian Wild Hop Cones: An Integrative Chemical, Antimicrobial, and Antibiofilm Activity and In Silico Docking Analysis. **Molecules**, v. 31, art. 405, 2026.

- [46] Guimarães, B. P.; Evaristo, R. B. W.; Ghesti, G. F. Prospecção tecnológica do lúpulo (*Humulus lupulus* L.) e suas aplicações com ênfase no mercado cervejeiro brasileiro. **Cadernos de Prospecção**, v. 14, p. 858-872, 2021.
- [47] Hieronymus, S. **For the love of hops: the practical guide to aroma, bitterness and the culture of hops**. Boulder: Brewers Publications, 2012.
- [48] Hsieh, M.-Y.; Hsieh, M.-J.; Lo, Y.-S.; Lin, C.-C.; Chuang, Y.-C.; Chen, M.-K.; Chou, M.-C. Xanthohumol targets the JNK1/2 signaling pathway in apoptosis of human nasopharyngeal carcinoma cells. **Environmental Toxicology**, v. 37, p. 1509–1520, 2022.
- [49] Janish, S. **The new IPA: scientific guide to hop aroma and flavor**. [S.l.]: Scott Janish, 2019.
- [50] Jiang, H.; Zhong, S.; Schwarz, P.; Chen, B.; Rao, J. Antifungal activity, mycotoxin inhibitory efficacy, and mode of action of hop essential oil nanoemulsion against *Fusarium graminearum*. **Food Chemistry**, v. 400, art. 134016, 2023.
- [51] Khaliullina, A.; Kolesnikova, A.; Khairullina, L.; Morgatskaya, O.; Shakirova, D.; Patov, S.; Nekrasova, P.; Bogachev, M.; Kurkin, V.; Trizna, E.; Kayumov, A. The Antimicrobial Potential of the Hop (*Humulus lupulus* L.) Extract against *Staphylococcus aureus* and *Oral Streptococci*. **Pharmaceuticals**, v. 17, art. 162, 2024.
- [52] Khiri, S.; El-Mrabet, A.; Boubal, Z.; Ullah, N.; Ullah, A.; Janati, W.; El Gueddari, L.; Chafik, A.; Lgaz, H.; Amalich, S.; Jacobson, G. M.; El maaiden, E. Valorization of residual biomass from essential oil extraction of *Ammodaucus leucotrichus*: A step towards sustainable cosmetic and pharmaceutical applications. **Biomass and Bioenergy**, v. 197, p. 107820, 2025.
- [53] Knez Hrnčič, M.; Španinger, E.; Košir, I. J.; Knez, Ž.; Bren, U. Hop compounds: extraction techniques, chemical analyses, antioxidative, antimicrobial, and anticarcinogenic effects. **Nutrients**, v. 11, art. 257, 2019.
- [54] Koetter, U. Hop (*Humulus lupulus*): a review of its historic and medicinal uses. **HerbalGram**, v. 87, p. 44–57, 2010.
- [55] Kontek, B.; Jedrejek, D.; Oleszek, W.; Olas, B. In vitro antiradical and antioxidant activity of hop-derived extracts rich in bitter acids and xanthohumol. **Industrial Crops and Products**, v. 161, p. 113208, 2021.
- [56] Korpelainen, H.; Pietilainen, M. Hop (*Humulus lupulus* L.): Traditional and Present Use, and Future Potential, **Economic Botany**, v. 75, p. 302–322, 2021.
- [57] Krajnović, T.; Pantelić, N.; Lobo, K.; Eichhorn, T.; Maksimović-Ivanić, D.; Mijatović, S.; Wessjohann, L. A.; Kaluđerović, G. N. Anticancer potential of xanthohumol and isoxanthohumol loaded into mesoporous silica particles SBA-15 against B16F10 melanoma cells. **Materials**, v. 15, p. 5028, 2022.

- [58] Ligor, M.; Stankevicius, M.; Wenda-Piesik, A.; Obelevicius, K.; Ragazinskiene, O.; Stanius, Ž.; Maruska, A.; Buszewski, B. Comparative gas chromatographic–mass spectrometric evaluation of hop (*Humulus lupulus* L.) essential oils and extracts obtained using different sample preparation methods. **Food Analytical Methods**, v. 7, p. 1433–1442, 2013.
- [59] Limberger, S. C.; Cunha, R. C. C. Dinâmica da produção e das importações de cevada e lúpulo para a indústria cervejeira no Brasil. **Revista Ciência Geográfica**, v. 29, p. 782-796, 2025.
- [60] 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**, v. 67, p. 8291–8302, 2019.
- [61] Liu, Z.; Qi, Y.; Gui, M.; Feng, C.; Wang, X.; Lei, Y. Sulfonated carbon derived from the residue obtained after recovery of essential oil from the leaves of *Cinnamomum longepaniculatum* using Brønsted acid ionic liquid, and its use in the preparation of ellagic acid and gallic acid. **Royal Society of Chemistry Advances**, v. 9, p. 5142-5150, 2019.
- [62] Long, K. C.; Ziegler, S. A.; THangamani, S.; Hausser, N. L.; Kocher, T. J.; Higgs, S.; Tesh, R. B. Experimental transmission of Mayaro virus by *Aedes aegypti*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, p. 750-757, 2011.
- [63] Lopes, F. B.; Souza, J. A.; Silva, M. R.; Santos, R. A.; Almeida, C. M.; Oliveira, L. S.; Costa, P. H.; Lima, A. C.; Barbosa, E. M.; Cavalcanti, I. M. F. *Commiphora leptophloeos* leaf and bark extracts modulate OxInflammation through TLR4/NF-κB/Nrf2 pathways. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 353, art. 120347, 2025.
- [64] Macchioni, V.; Carbone, K.; Cataldo, A.; Frascini, R.; Bellucci, S. Lactic acid-based natural deep eutectic solvents for the extraction of bioactive metabolites from *Humulus lupulus* L.: supramolecular organization, phytochemical profile and biological activity. **Separation and Purification Technology**, v. 264, p. 118039, 2021.
- [65] Maietti, A.; Brighenti, V.; Bonetti, G.; Tedeschi, P.; Príncipe, FP; Benvenuti, S.; Brandolini, V.; Pellati, F. Metabolite profiling offlavonols and in vitro antioxidant activity of young shoots of wild *Humulus lupulus* L. (hop). **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 142, p. 28–34, 2017.
- [66] Maliar, T.; Nemeček, P.; Ůrgeová, E.; Maliarova, M.; Nesvadba, V.; Krofta, K.; Vulganová, K.; Krošlák, E.; Kraic, J. Secondary metabolites, antioxidant and anti-proteinase activities of methanolic extracts from cones of hop (*Humulus lupulus* L.) cultivars. **Chemical Papers**, v. 71, p. 41–48, 2017.
- [67] Mandova, T.; Saivish, M. V.; La Serra, L.; Nogueira, M. L.; Da Costa, F. B. Identification of Potential Antiviral Hops Compounds against Chikungunya Virus. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, art. 3333, 2023.
- [68] Marques, S. P. D.; Trevisan, M. T. S.; Owen, R. W.; Silva, A. M. A.; Nascimento, G. M. F.; Lima, S. S. F.; Lima, C. T.; Brito, S. E.; Magalhães, R, C, H.; Silva, F. L.F.

Avaliação quantitativa de ácidos amargos, xanthohumol e óleos essenciais presentes em flores de diferentes cultivares de *Humulus lupulus* L. produzidas na região Nordeste do Brasil. **Química Nova**, v. 47, n. 2, p. 1–12, 2024.

[69] Michiu, D.; Delvigne, F.; Mabon, N.; Jimborean, M.; Melinda, F.; Mihai, M.; Tofana, M.; Thonart, P. Inhibitory effects of iso- α and β hop acids against *Pediococcus pentosaceus*. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 47, p. 1316–1322, 2019.

[70] Milojevic, S. Z.; Stanojevic, J. S.; Stanojevic, L. P.; Mitic, M. N.; Djordjevic, D. M.; Savic, I. M. Essential Oil Quality and Purity Evaluation via FT-IR Spectroscopy and Pattern Recognition Techniques. **Applied Sciences**, v. 10, p. 7294, 2020.

[71] Natarajan, P.; Katta, S.; Ambati, V. B. R.; Leonida, M.; Haas, G. J. Positive antibacterial co-action between hop (*Humulus lupulus*) constituents and selected antibiotics. **Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**, v. 15, p. 194–201, 2008.

[72] Ocvirk, M.; Grdadolnik, J.; Kosir, I. J. Determination of the botanical origin of hops (*Humulus lupulus* L.) using different analytical techniques in combination with statistical methods. **Journal of the Institute of Brewing**, p. 452–461, 2016.

[73] Odds, F. C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, p. 1, 2003.

[74] Olsovská, J.; Bostikava, V.; Dusek, M.; Jandovská, V.; Bogdanova, K.; Cermak, P.; Bostik, P.; Mikyska, A.; Kolar, M. *Humulus lupulus* L. (Hops) - a valuable source of compounds with bioactive effects for future therapies. **Military Medical Science Letters**, v. 85, n. 1, p. 19–30, 2016.

[75] Önder, F. C.; Ay, M.; Sarker, S. D. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of the extracts of *Humulus lupulus* L. and quantification of bioactive components by LC-MS/MS and GC-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61 p. 10498–10506, 2013.

[76] Ovidi, E.; Laghezza Masci, V.; Taddei, AR; Torresi, J.; Tomassi, W.; Iannone, M.; Tiezzi, A.; Maggi, F.; Garzoli, S. Hemp (*Cannabis sativa* L., Kompolti cv.) and hop (*Humulus lupulus* L., Chinook cv.) essential oil and hydrolate: HS-GC-MS chemical investigation and apoptotic activity evaluation. **Pharmaceuticals**, v. 15, art. 976, 2022.

[77] Paguet, A. S.; Siah, A.; Lefevre, G.; Sahpaz, S.; Riviere, C. Agronomic, genetic and chemical tools for hop cultivation and breeding. **Phytochemistry Reviews**, v. 21, p. 667–708, 2022.

[78] Palmer, J. **How to brew: everything you need to know to brew great beer every time**. 4. ed. Boulder: Brewers Publications, 2017.

[79] Paniagua-García, A. I.; Ibáñez, A.; Díez-Antolínez, R. Green Antimicrobials: Innovative Applications of Hops Extracts as Biocontrol Agents. **Pathogens**, v. 14, art. 418, 2025.

- [80] Pereira, L. F.; Bogusz Júnior, S.; Hantao, L. W.; Campolina, G. A.; Minetto, A. F.; Souza, A. L. C.; Mori, L. B. de; Cardoso, M. G.; Nunes, C. A.; Pedroso, M. P. Comparative Assessment of the Chemical Composition of Locally Cultivated and Imported Hops (*Humulus lupulus* L.) in Brazil Using Chemometrics. **ACS Food Science & Technology**, v. 5, p. 4529-4539, 2025.
- [81] Pérez, M.; Dominguez-López, I.; Lamuela-Raventós, R. M. The chemistry behind the Folin–Ciocalteu method for the estimation of (poly)phenol content in food: total phenolic intake in a Mediterranean dietary pattern. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 71, p. 17543–17553, 2023.
- [82] Piasecki, B.; Biernasiuk, A.; Ludwiczuk, A. Anti-Coccal Activity and Composition of the Essential Oils and Methanolic Extracts Obtained from Brewing Quality *Humulus lupulus* L. Hop Pellets. **Pharmaceuticals**, v. 16, art. 1098, 2023.
- [83] Pinheiro, P. F.; Costa, A. V.; Alves, T. D. A.; Galter, I. N.; Pinheiro, C. A.; Pereira, A. F.; Oliveira, C. M. R.; FONTES, M. M. P. Phytotoxicity and cytotoxicity of essential oil from leaves of *Plectranthus amboinicus*, carvacrol and thymol in plant bioassays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 63, p. 8981-8990, 2015.
- [84] Pliny & Elder. **Natural History**. Translated by H. Rackham. Cambridge: Harvard University Press, 1945.
- [85] Pohjanvirta, R.; Nasri, A. The potent phytoestrogen 8-prenylnaringenin: friend or foe? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, art 3168, 2022.
- [86] Purgato, G. A.; Silva, L. O.; Santos, B. F.; Moraes, M. S.; Oliveira, F. C; Barbosa, L. F.; Campos, A. P.; Silva, L. H.; Furlan, M.; Duarte, M. C. T.; Sartoratto, A. Isolation and identification of antimicrobial multicyclic terpenoids from the medicinal plant *Salvia officinalis* and development of a formulation against clinical *Staphylococcus aureus* strains. **Letters in Applied Microbiology**, v. 77, art. ovae077, 2024.
- [87] Ramazzina, I.; Macchioni, V.; Carbone, K. Antioxidant and pro-oxidant phytochemicals in hop cone extracts obtained by ultrasound and microwave: a statistical modeling approach. **Food & Function**, v. 13, p. 9589–9601, 2022.
- [88] Raut, J. S.; Karuppayil, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 250–264, 2014.
- [89] Rettberg, N.; Biend, M.; Garbe, L. Hop Aroma and Hoppy Beer Flavor: Chemical Backgrounds and Analytical Tools - A Review. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**. v. 76, p. 1-20, 2018.
- [90] Rozalski, M.; Micota, B.; Sadowska, B.; Stochmal, A.; Jedrejek, D.; Wieckowska-Szakiel, M.; Rozalska, B. Antiadherent and Antibiofilm Activity of *Humulus lupulus* L. Derived Products: New Pharmacological Properties. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–7, 2013.

- [91] Rutnik, K.; Knez Hrnčič, M.; Jože Košir, I. Hop essential oil: chemical composition, extraction, analysis and applications. **Food Reviews International**, p. 1–23, 2021.
- [92] Santarelli, V.; Neri, L.; Carbone, K.; Macchioni, V.; Pittia, P. Use of conventional and innovative technologies for the production of food-grade hop extracts: focus on bioactive compounds and antioxidant activity. **Plants**, v. 11, art. 41, 2022.
- [93] Santos, M. F.; Almeida, R. S.; Barros, L. M.; Ferreira, P. R.; Castro, J. V. Perspectivas do cultivo de lúpulo no Brasil: desafios e oportunidades. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 28, p. 45–56, 2022.
- [94] Schmalreck, A. F.; Teuber, M. Structural features determining the antibiotic potencies of natural and synthetic hop bitter resins, their precursors and derivatives. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 21, p. 205–212, 1975.
- [95] Schoss, K.; Kočevár Glavač, N.; Dolenc Koce, J.; Anžlovar, S. Supercritical CO₂ plant extracts show antifungal activities against crop-borne fungi. **Molecules**, v. 27, art. 1132, 2022.
- [96] Stevens, J. F.; Page, J. E. Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health? **Phytochemistry**, v. 65, p.1317-1330. 2004.
- [97] Serkani, J. E.; Isfahani, B. N.; Safaei, H. G.; Kermanshahi, R. K.; Asghari, G. Evaluation of the effect of alcoholic extract of *Humulus lupulus* on rifampin-sensitive and resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 7, p. 235–242, 2012.
- [98] Silva, G. C. C.; Silva, F. P. A.; Beirão, G. A. R.; Severino, J. J.; Machado, M. A.; Barbosa, M. P. S. B.; Reyes, G. B.; Rickeli, M. E.; Lopes, A. D.; Nascimento, G. I. E. F.; Valle, J. S.; Gonçalves, J. E.; Freitas, J. P.; Bordin, B. C. B.; Gazim, Z. C. Phytochemical Profile, Antioxidant Capacity, and Photoprotective Potential of Brazilian *Humulus lupulus*. **Pharmaceuticals**, v. 18, art. 1229, 2025.
- [99] Singh, R. P.; Chidambara Murthy, K. N.; Jayaprakasha, G. K. Studies on the Antioxidant Activity of Pomegranate (*Punica granatum*) Peel and Seed Extracts Using in Vitro Models. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 81-86, 2002.
- [100] Sławińska-Brych, A.; Mizerska-Kowalska, M.; Król, SK; Stepulak, A.; Zdzisińska, B. Xanthohumol impairs PMA-induced invasive behaviour of A549 lung cancer cell line and exerts anti-EMT action. **Cells**, v. 10, art. 1484, 2021.
- [101] Steele, M. **IPA: brewing techniques, recipes and the evolution of India Pale Ale**. Boulder: Brewers Publications, 2012.
- [102] Stepanovic, S.; Vukovic, D.; Hola, V.; Bonaventura, G. D.; Djukic, S.; Cirkovic, I.; Ruzicka, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by *staphylococcus*. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 115, p. 891–899, 2007.

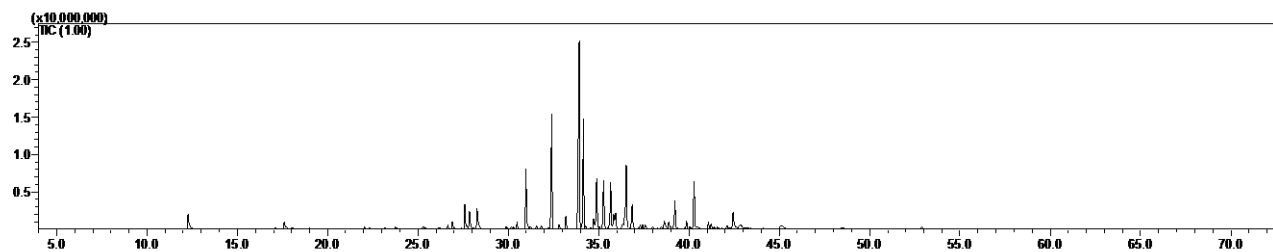
- [103] Stephan, T. E.; Ngo, E. O.; Nutter, L. M. Hexahydrocolupulone and its cell proliferation antitumor activity in vitro. **Biochemical Pharmacology**, v. 55, p. 505–514, 1998.
- [104] Sun, B.; Ao, Y. L.; Cao, X.; Zhang, J. B.; Zhang, X.; Lu, D. H.; Lin, M.; Liu, J. S.; Zhang, X. Q. Hop bitter acids from the pistillate flower of *Humulus lupulus* L. and their anti-inflammatory and anti-dengue virus activities. **Phytochemistry**, v. 241, art. 114689, 2026.
- [105] Sun, S.; Wang, X.; Yuan, A.; Liu, J.; Li, Z.; Xie, D.; Zhang, H.; Luo, Wenqing; Xu, H.; Liu, J.; Nie, C.; Zhang, H. Chemical constituents and bioactivities of hops (*Humulus lupulus* L.) and their effects on beer-related microorganisms. **Food and Energy Security**, v. 11, art. 367, 2022.
- [106] Tagashira, M.; Watanabe, M.; Uemitsu, N. Antioxidative activity of hop bitter acids and their analogues. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 59, p. 740–742, 1995.
- [107] Taiz, L.; Zeiger E. **Fisiologia vegetal**. 4ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.
- [108] Tobe, H.; Kubota, M.; Yamaguchi, M.; Kocha, T.; Aoyagi, T. Apoptosis to HL-60 by humulone. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 61, p. 1027–1029, 1997.
- [109] TOP HOP. **History of hop cultivation**. [S. l.], [s. d.]. Disponível em: <https://www.hop.cz/en/hops/history-of-hop-cultivation/>. Acesso em: 13 maio 2026.
- [110] Unger, R. W. **Beer in the Middle Ages and the Renaissance**. Philadelphia: University of Pennsylvania Press, 2004.
- [111] Truzzi, E.; Bertelli, D.; Benvenuti, S.; Brighenti, V.; Pellati, S. Rapid Classification and Recognition Method of the Species and Chemotypes of Essential Oils by ATR-FTIR Spectroscopy Coupled with Chemometrics. **Molecules**, v. 27, p. 5618, 2022.
- [112] Vadeboncoeur, N. **The story of hops**. Project Hop, [S. l.], 28 jun. 2024. Disponível em: <https://projecthop.beer/articles/2024/6/26/the-story-of-hops>. Acesso em: 13 maio 2026.
- [113] Ventura, B. M. L.; Nguema, O. G. A. A.; Carvalho, R. L.; Pinheiro, P. F.; Silva, A. C. T.; Godoy, S. A. M.; Ferreira, B. B.; Moura, C. M.; Vasconcellos, R. S.; Paula, S. O.; Oliveira, L. L.; Teixeira, M. D. O. Evaluation of Antiviral Activity of *N*-Phenyl-2-Phenoxyacetamides Derived from, Carvacrol Against Mayaro Vírus: In Vitro Analyses and In Silico Insights. **ACS Omega**, v. 10, p. 57085–57096, 2025.
- [114] Verberg, S. **From Herbal to Hopped Beer: The Displacement of Regional Herbal Beer Traditions by Commercial Export Brewing in Medieval Europe**. 2020. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/346930430>. Acesso em: 13 maio 2026.

- [115] Wang, F.; Cho, B.O.; Shin, J.Y.; Hao, S.; Jang, S.I. Humulus japonicus extract alleviates oxidative stress and apoptosis in 6-hydroxydopamine-induced PC12 cells. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 12, p. 197–206, 2022.
- [116] Wang, G.; Tian, L.; Aziz, N.; Broun, P.; Dai, X.; HE, J.; King, A.; Zhao, P. X.; DI, R. A. Terpene biosynthesis in glandular trichomes of hop. **Plant Physiology**, v. 148, n. 3, p. 1254–1266, 2008.
- [117] Wang, S.; Dunlap, T. L.; Howell, C. E.; Mbachu, O. C.; Rue, E. A.; Phansalkar, R.; Chen, S. N.; Pauli, G. F.; Dietz, B. M.; Bolton, J. L. Hop (*Humulus lupulus* L.) extract and 6-prenylnaringenin induce P450 1A1-catalyzed estrogen 2-hydroxylation. **Chemical Research in Toxicology**, v. 29, p. 1142–1150, 2016.
- [118] Wang, X.; Yang, L.; Yang, X.; Tian, Y. In vitro and in vivo antioxidant and antimutagenic activities of polyphenols extracted from hops (*Humulus lupulus* L.). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, p. 1693–1700, 2014.
- [119] Weber, N.; Biehler, K.; Schwabe, K.; Haarhaus, B.; Quirin, K.W.; Frank, E.U.A.; Schempp, C. M.; Wölfl, U. Hop extract acts as an antioxidant with antimicrobial effects against *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus aureus*. **Molecules**, v. 24, art. 223, 2019.
- [120] Wu, Chun-Nan; Sun, Li-Chin; Chu, Yung-Lin; Yu, Roch-Chui; Hsieh, Chang-Wei; Hsu, Hsien-Yi; Hsu, Fu-Chiun; Cheng, Kuan-Chen. Bioactive compounds with anti-oxidative and anti-inflammatory activities of hop extracts. **Food Chemistry**, v. 330, p. 127244, 2020.
- [121] Yan, Y. F.; Wu, T. L.; Du, S.S.; Wu, Z. R.; Hu, Y. M.; Zhang, Z. J.; Zhao, W. B.; Yang, C. J.; Liu, Y. Q. The antifungal mechanism of isoxanthohumol from *Humulus lupulus* Linn. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, p. 10853, 2021.
- [122] Yang, J.; Liu, Z.; Chen, P.; Du, W.; Fan, X.; Shi, M.; Liu, Y. Antioxidant and antibacterial activities of β -acid homologues mixtures with different hop ratios. **Food Science**, v. 41, p. 83–90, 2020.
- [123] Yap, P. S. X.; Lim, S. H. E.; Hu, C. P.; Yiap, B. C. Combination of essential oils and antibiotics reduce antibiotic resistance in plasmid-conferred multidrug resistant bacteria. **Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**, v. 20, p. 710–713, 2013.
- [124] Yu, H.; Guo, L.; Liu, S. Evolution and domestication of the hop plant (*Humulus lupulus*). **Plant Science**, v. 335, p. 111–118, 2023.
- [125] Zanolli, P.; Zavatti, M. Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p. 383–396, 2008.
- [126] Zhang, G.; Zhang, N.; Yang, A.; Huang, J.; Ren, X.; Xian, M.; Zou, H. Hop bitter acids: resources, biosynthesis and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, p. 4343–4356, 2021.

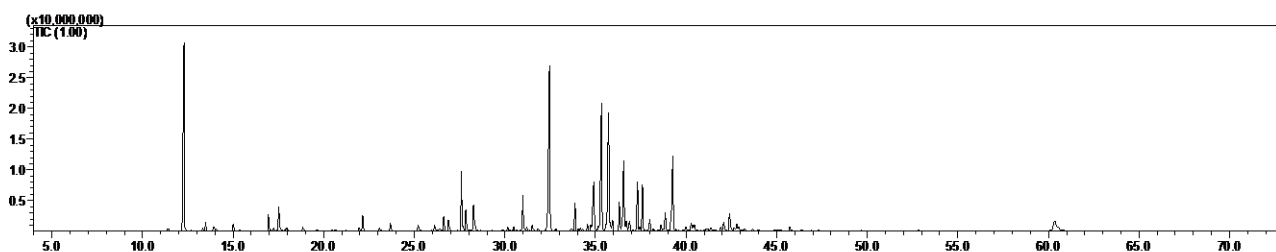
8 Apêndice

Apêndice A. Cromatogramas de íons totais para os OEs das variedades: **A-** *Cascade*, **B-** *Comet*, **C-** *Magnum*, **D-** *Zeus*.

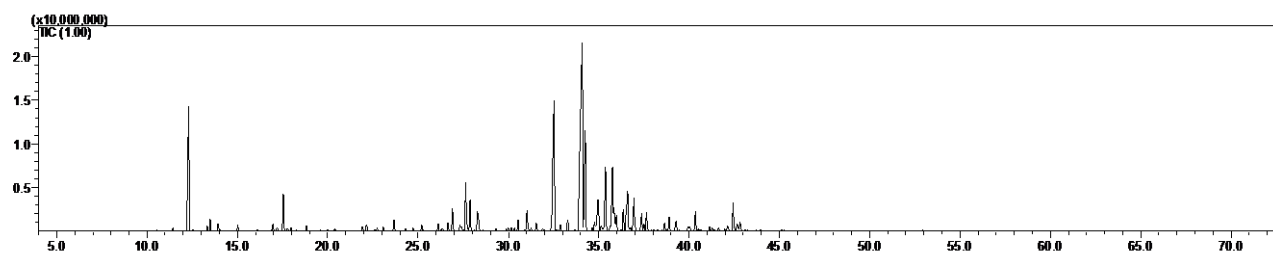
A



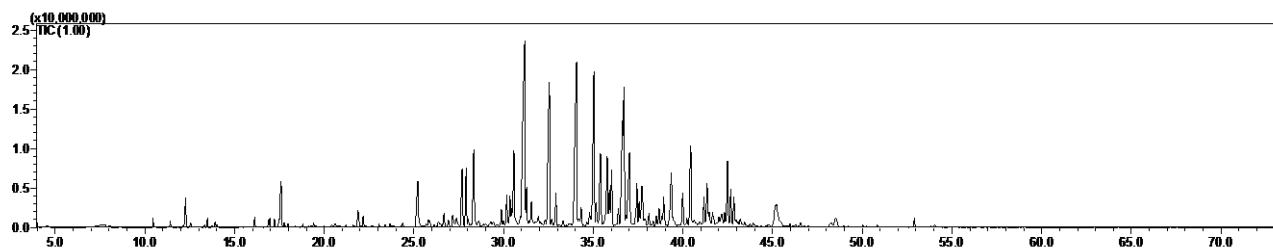
B



C

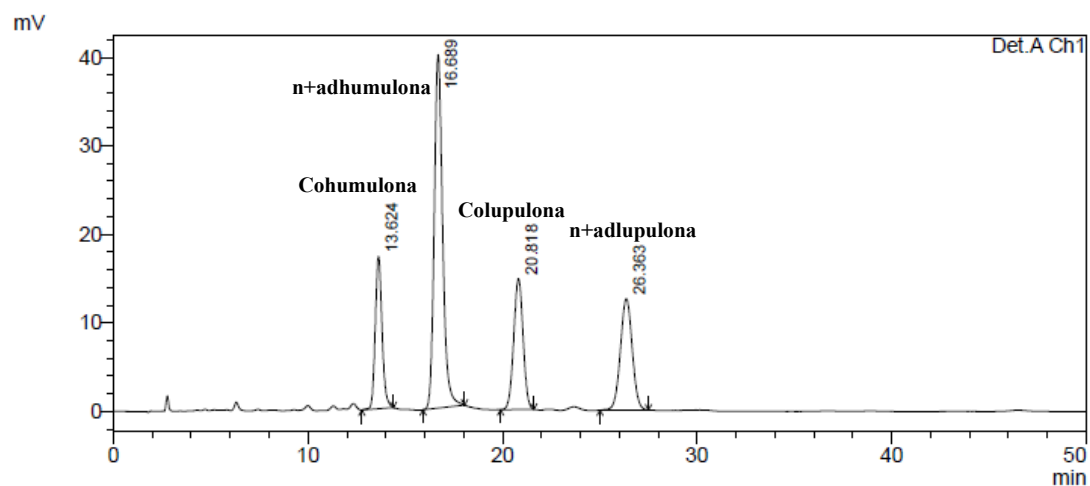


D

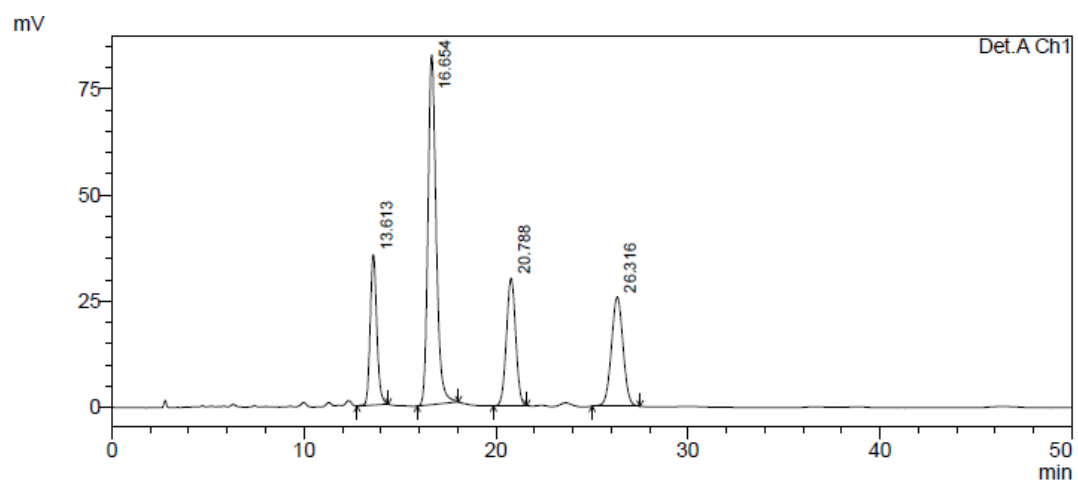


Apêndice B. Cromatogramas obtidos do padrão ICE-4 extraído com metanol, acidificado com 0,025% de ácido fórmico nas seguintes concentrações: 0,187 mg/mL (A); 0,375 mg/mL (B); 0,75 mg/mL (C); 1,5 mg/mL (D); 3,0 mg/mL (E) e 6,0 mg/mL (F).

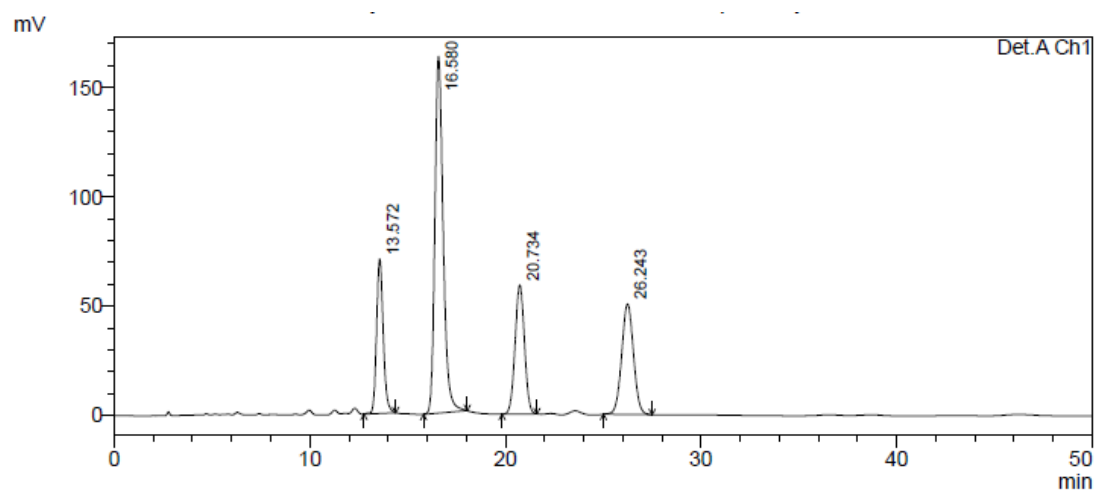
A

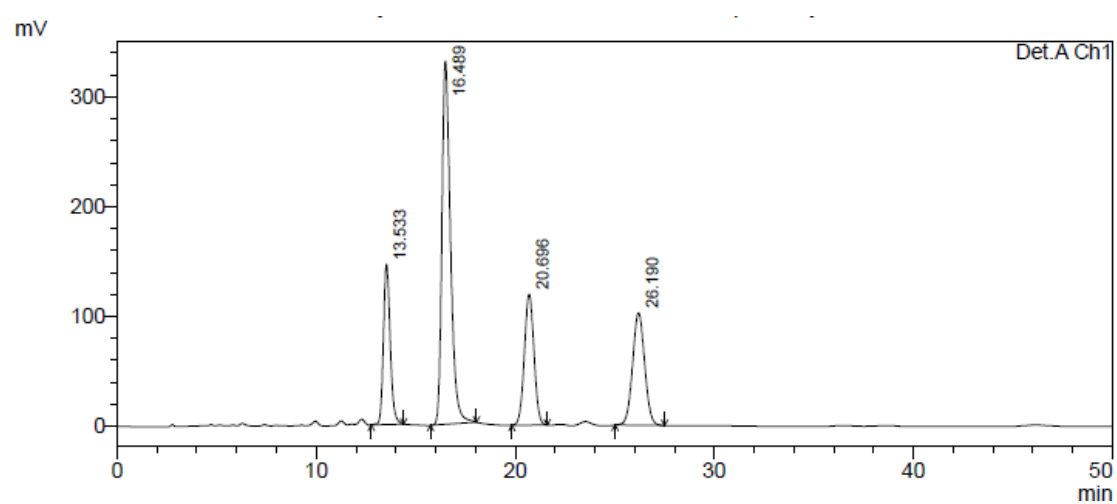
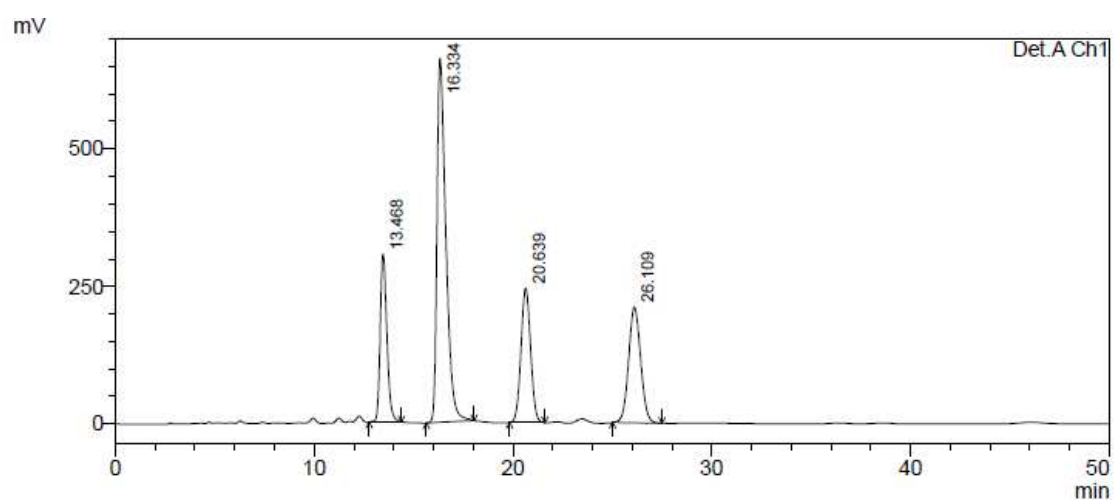
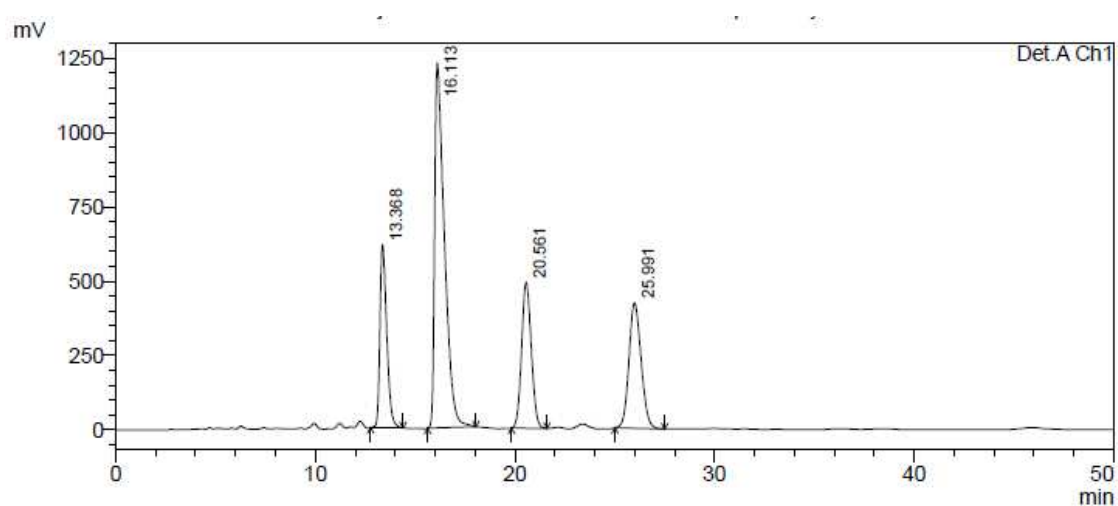


B



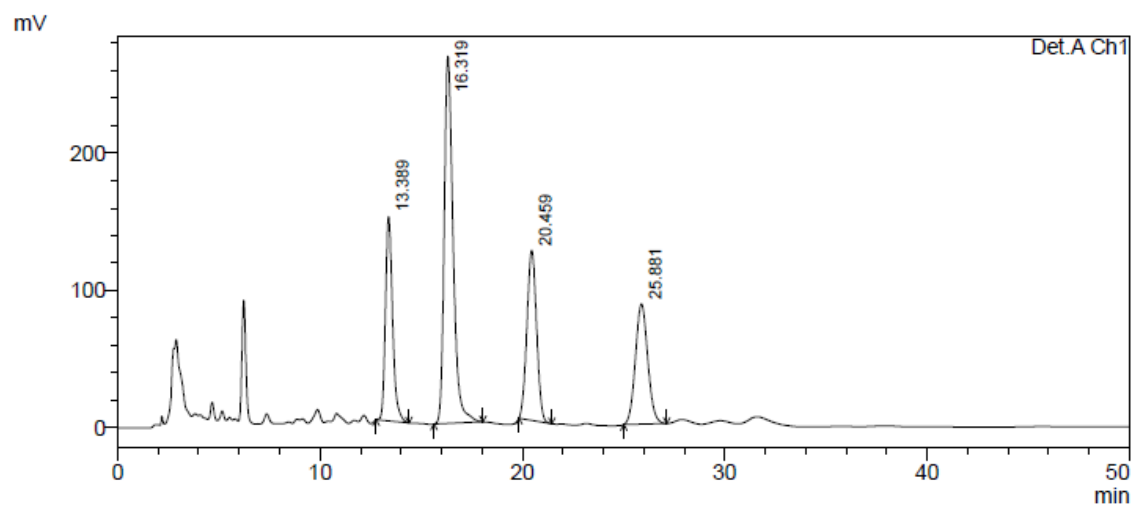
C



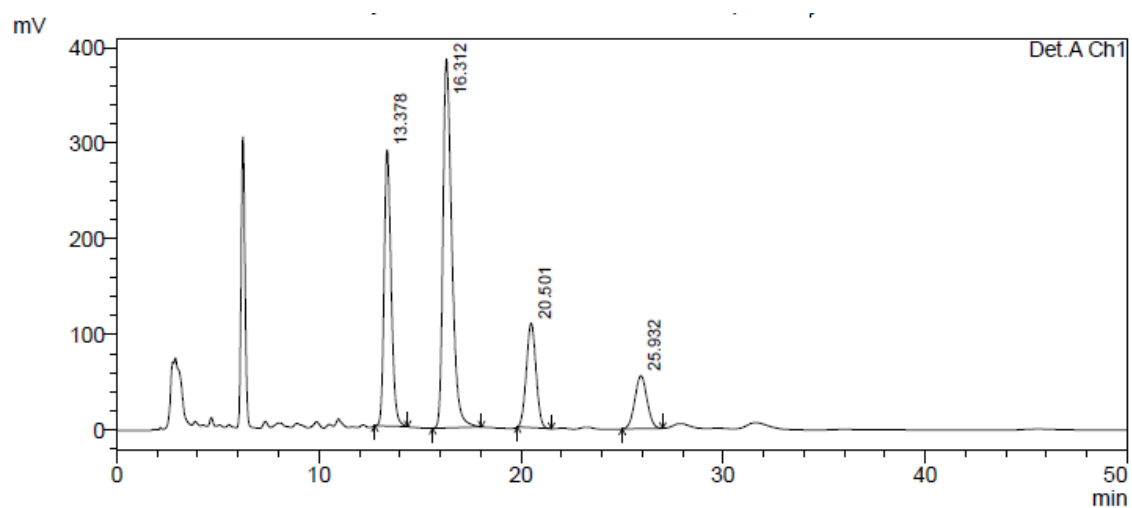
D**E****F**

Apêndice C. Cromatogramas dos *pellets* dos lúpulos extraídos com 85% metanol, 15% água MilliQ, acidificado com 0,025% ácido fórmico: A-*Cascade*, B-*Comet*, C-*Magnum* e D-*Zeus*.

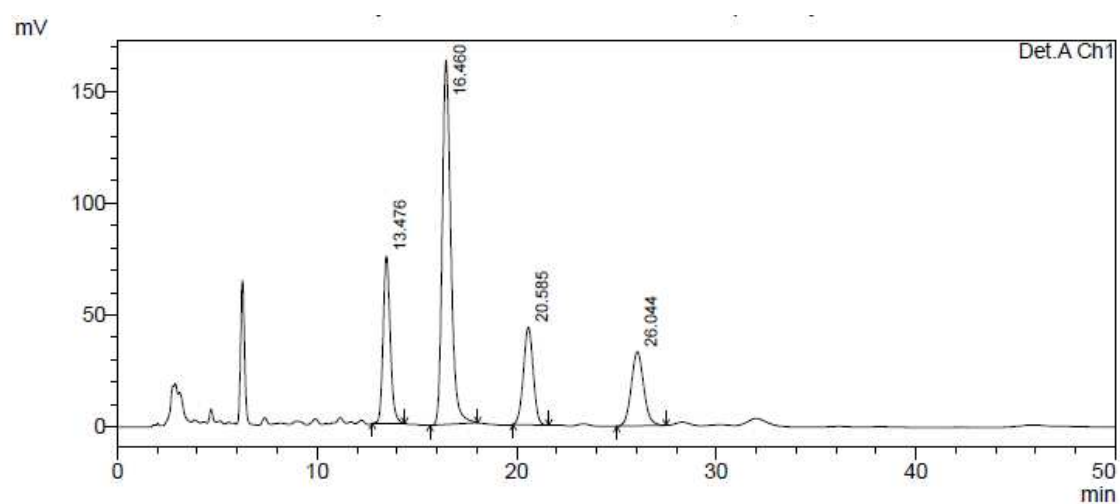
A

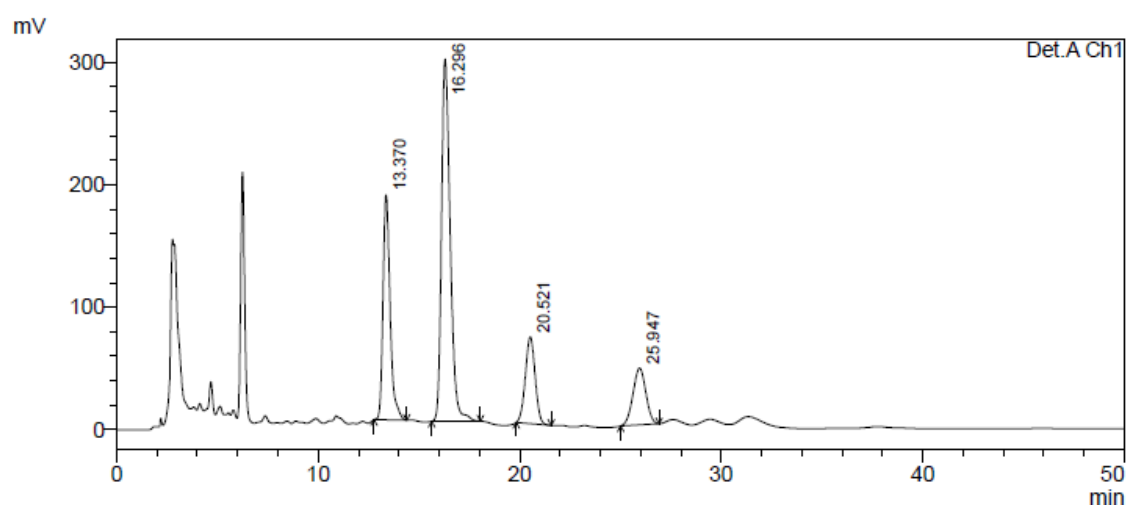


B

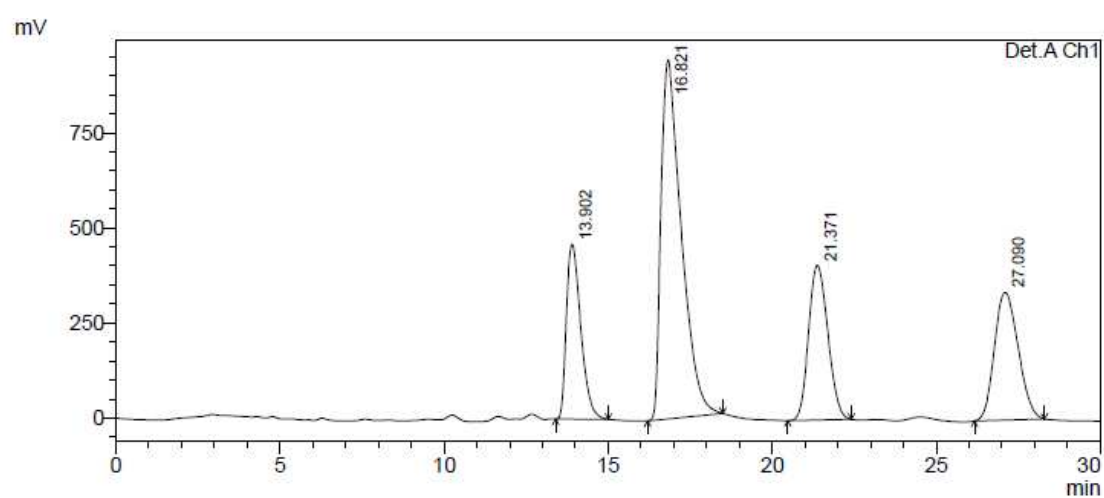


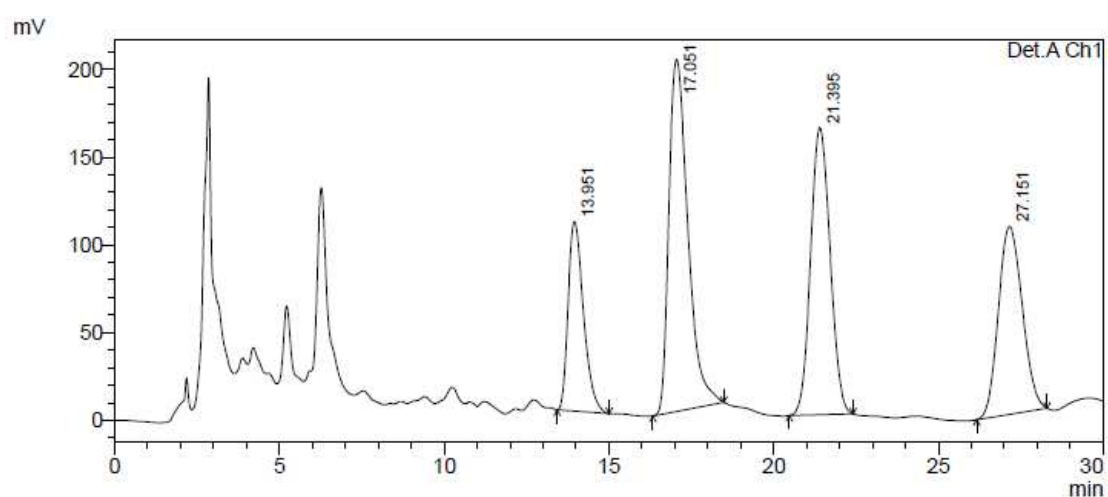
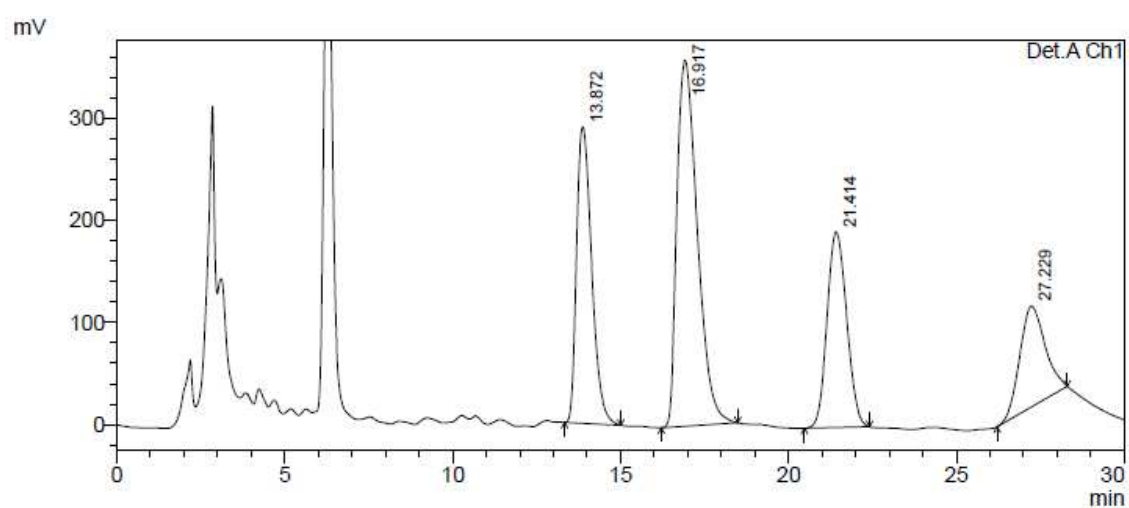
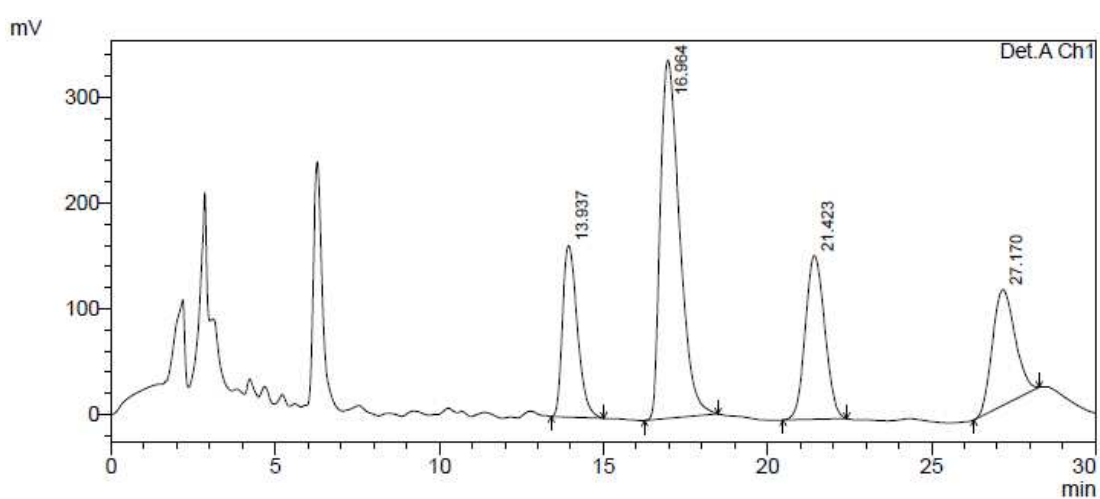
C



D

Apêndice D. Cromatogramas dos EEs dos lúpulos. A- Padrão ICE-4 solubilizado em etanol na concentração de 6 ppm. B- EE da variedade *Cascade*. C- EE da variedade *Comet*. D- EE da variedade *Magnum*. E- EE da variedade *Zeus*.

A

B**C****D**

E