



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

TARSILA RODRIGUES ARRUDA

**ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DOS PRIMEIROS
CULTIVARES DE LÚPULO (*Humulus lupulus* L.) PRODUZIDOS NO BRASIL**

ALEGRE – ES

FEVEREIRO – 2020

TARSILA RODRIGUES ARRUDA

**ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DOS PRIMEIROS
CULTIVARES DE LÚPULO (*Humulus lupulus* L.) PRODUZIDOS NO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dra. Patrícia Campos Bernardes
Coorientadoras: Prof^a. Dra. Patrícia Fontes Pinheiro
Prof^a. Dra. Pollyanna Ibrahim Silva

ALEGRE – ES
FEVEREIRO – 2020

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

A773a Arruda, Tarsila Rodrigues, 1995-
Atividades antioxidante e antimicrobiana dos primeiros
cultivares de lúpulo (*Humulus lupulus* L.) produzidos no Brasil
/ Tarsila Rodrigues Arruda. - 2020.
84 f. : il.

Orientadora: Patrícia Campos Bernardes.

Coorientadores: Patrícia Fontes Pinheiro, Pollyanna Ibrahim
Silva.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de
Alimentos) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de
Ciências Agrárias e Engenharias.

1. Antioxidantes. 2. Compostos bioativos. 3. Fenóis. 4.
Alimentos. I. Bernardes, Patrícia Campos. II. Pinheiro, Patrícia
Fontes. III. Silva, Pollyanna Ibrahim. IV. Universidade Federal
do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.
V. Título.

CDU: 664

TARSILA RODRIGUES ARRUDA

**“ ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DOS
PRIMEIROS CULTIVARES DE LÚPULO (*Humulus lupulus* L.)
PRODUZIDOS NO BRASIL ”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Aprovada em 28 de fevereiro de 2020.



Prof^a. Dr^a. Patrícia Campos Bernardes
Universidade Federal de Espírito Santo-UFES
Orientadora



Prof^a. Dr^a. Pollyanna Ibrahim Silva
Universidade Federal do Espírito Santo-UFES
Coorientadora



Prof^a. Dr^a. Patrícia Fontes Pinheiro
Universidade Federal do Espírito Santo-UFES
Examinadora

AGRADECIMENTOS

Uma etapa muito importante em minha vida se encerra e eu não poderia deixar de agradecer aos que fizeram parte desta jornada.

Agradeço a Deus, por sempre guiar meu caminho e me dar forças nos momentos que mais precisei.

À Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PCTA) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro e concessão da bolsa.

Aos meus pais, Célio e Vera, por todo amor, compreensão, apoio e incentivo. À minha irmã, Tainã, pela amizade e parceria de sempre. À minha avó, Maria, por toda preocupação e carinho. Uma certeza eu tenho: sem vocês eu nada seria.

Ao André por todo amor, apoio, amizade e companheirismo que foram fundamentais nesta etapa (e por me socorrer após longas jornadas no laboratório).

À minha orientadora, Prof^a. Dra. Patrícia Campos Bernardes, por todo incentivo, aprendizado, confiança e amizade ao longo de todos esses anos. Obrigada por acreditar em meu trabalho. Espero que nossa parceria prospere para a vida.

À minhas coorientadoras, Prof^a. Dra. Patrícia Fontes Pinheiro e Prof^a. Dra. Pollyanna Ibrahim Silva, por todo apoio e disponibilidade, por compartilharem seu entusiasmo com essa pesquisa.

Aos professores que me auxiliaram com o desenvolvimento da estatística dessa pesquisa, Prof. Dr. Sérgio Henriques Saraiva e Prof. Dr. Joel Camilo Souza Carneiro, pelo auxílio e disponibilidade.

Aos técnicos dos laboratórios e funcionários do PCTA, em especial Letícia, Maurício, Mayara e Toninho, por toda colaboração.

Às meninas que me ajudaram durante a parte experimental: Bianca e Daniela.

Aos professores do PCTA por todo o conhecimento.

À Nayra e Laís, cuja amizade foi indispensável para tornar essa experiência mais leve. Obrigada pelos muitos momentos juntas. Ainda temos muitas festas de aniversário surpresa para planejar.

À Renatha, minha amiga de longa data que se faz presente sempre, apesar da distância.

A todos os meus amigos, aos que carrego comigo há um bom tempo e aos que aceitaram compartilhar comigo os últimos dois anos, meu muito obrigada!

Agradeço ainda ao produtor Paulo Cordeiro (*“in memorian”*), pelo fornecimento das amostras de lúpulo, sem as quais este trabalho não poderia ser realizado.

Dentre os altos e baixos do mestrado, agradeço a todos que fizeram desta, uma experiência única. Muitos momentos que guardarei eternamente possibilitaram um enorme crescimento pessoal e profissional. Gratidão!

LISTA DE FIGURAS

Artigo 2. Artigo original: Composição química e atividades antioxidante e antimicrobiana de lúpulos (*Humulus lupulus* L.) produzidos no Brasil: uma nova perspectiva

Figura 1. Efeito da concentração dos extratos de lúpulo no crescimento de *Byssochlamys nivea*; $y = -14,8841 + 70,5833e^{-0,0629x}$, $R^2 = 0,9782$; y: diâmetro micelial (mm); x: concentração dos extratos ($\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$); R^2 : coeficiente de determinação.....55

LISTA DE TABELAS

Artigo 1. Artigo de revisão: Lúpulo (*Humulus lupulus* L.) na produção de alimentos: um insumo exclusivo da indústria cervejeira?

Tabela 1. Exemplos de aplicações de lúpulo em matrizes alimentícias.....18

Artigo 2. Artigo original: Composição química e atividades antioxidante e antimicrobiana de lúpulos (*Humulus lupulus* L.) produzidos no Brasil: uma nova perspectiva

Tabela 1. Conteúdo de fenóis totais, flavonoides totais e atividade antioxidante das cultivares de lúpulo (média \pm desvio padrão, n=3)44

Tabela 2. Médias de diâmetros das zonas de inibição, em mm, dos extratos obtidos para as diferentes variedades de lúpulo frente cinco bactérias patogênicas (média \pm desvio padrão, n=3).....47

Tabela 3. Concentração Mínima Inibitória (MIC) e Concentração Mínima Bactericida (MBC), em mg.mL⁻¹, dos extratos referentes às variedades de lúpulo frente a cinco patógenos alimentares.....50

Tabela 4. Médias do diâmetro micelial, em mm, do fungo *Byssochlamys nivea* para cada extrato obtido das variedades de lúpulo em estudo (média \pm desvio padrão, n=3).....54

Tabela 5. Composição das cultivares de lúpulo quanto ao teor de α -ácidos e β -ácidos (média \pm desvio padrão , n=3).....57

SUMÁRIO

RESUMO.....	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Referências bibliográficas	3
2. OBJETIVOS.....	6
2.1. Objetivo geral.....	6
2.2. Objetivos específicos	6
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
Lúpulo (<i>Humulus lupulus</i> L.) na produção de alimentos: um insumo exclusivo da indústria cervejeira?	7
4. ARTIGO ORIGINAL.....	32
Composição química e atividades antioxidante e antimicrobiana de lúpulos (<i>Humulus lupulus</i> L.) produzidos no Brasil: uma nova perspectiva	32
5. CONCLUSÃO	68
APÊNDICE A – Material suplementar (Artigo 2).....	69

RESUMO

“ARRUDA, Tarsila Rodrigues”. **Atividades antioxidante e antimicrobiana dos primeiros cultivares de lúpulo (*Humulus lupulus* L.) produzidos no Brasil**. 2020. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre – ES. Orientador: Prof^ª. Dra. Patrícia Campos Bernardes. Coorientador(as): Prof^ª. Dra. Patrícia Fontes Pinheiro, Prof^ª. Dra. Pollyanna Ibrahim Silva.

O lúpulo (*Humulus lupulus* L.) é uma planta que tem demonstrado grande versatilidade como matéria-prima em indústrias alimentícias e farmacêuticas. Imprescindível na produção da cerveja, está associado a características de sabor, aroma e propriedades antioxidante e antimicrobiana da bebida, as quais variam de acordo com a cultivar utilizada. Tentativas de plantio de lúpulo têm sido feitas no Brasil, visando futuramente sua produção em larga escala. Entretanto, pouco se tem conhecimento a respeito das propriedades inerentes às cultivares brasileiras. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana e a atividade antioxidante de cultivares de lúpulo produzidas no Brasil, bem como determinar a composição química dos α - e β -ácidos (resinas moles) presentes em sua constituição. Foram analisados os teores de fenóis totais, flavonoides totais, atividade antioxidante através dos radicais DPPH e ABTS⁺. Foi verificada a atividade antimicrobiana de extratos hidroetanólicos de lúpulo, frente a microrganismos patogênicos e deterioradores. A composição de α e β -ácidos dos extratos foi determinada por *Ultra Performance Liquid Chromatography* (uPLC). Os dados obtidos permitiram visualizar o perfil de cada cultivar, quanto às suas propriedades e potenciais aplicações. Num panorama geral, as cultivares brasileiras mostraram-se boas fontes de compostos fenólicos, incluindo flavonoides. Além disso, as cultivares produzidas no país evidenciaram elevados teores de resinas moles, em especial as cultivares Vitória, Columbus e “Canastra” que apresentaram valores excepcionalmente altos dos compostos mencionados, chegando a representarem 60% da constituição dos extratos. Tais características influenciaram positivamente as propriedades antioxidante e antimicrobiana das cultivares, a exemplo da atividade dos extratos de lúpulo frente a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*. Os extratos de lúpulo mostraram ainda possuir atividade antifúngica, inibindo quase completamente o crescimento micelial do fungo *Byssochlamys nivea*, quando na maior concentração testada (20 μ L.mL⁻¹). Assim, foi possível verificar o potencial ainda pouco explorado das cultivares de lúpulo produzidas no Brasil, cujas propriedades antioxidante e antimicrobiana indicam boa aplicabilidade deste insumo.

Palavras-chave: lúpulo brasileiro, compostos fenólicos, resinas moles, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

ARRUDA, Tarsila Rodrigues. **Antioxidant and antimicrobial activities of the first hop (*Humulus lupulus* L.) cultivars produced in Brazil**. 2020. Dissertation (Master in Food Science and Technology) – Federal University of Espírito Santo, Alegre – ES. Advisor: Prof^a. Dra. Patrícia Campos Bernardes. Co-advisors: Prof^a. Dra. Patrícia Fontes Pinheiro, Prof^a. Dra. Pollyanna Ibrahim Silva.

Hop (*Humulus lupulus* L.) is a plant that has shown great versatility as a raw material in food and pharmaceutical industries. Essential for beer production, it is associated with flavor, aroma and antioxidant and antimicrobial properties of the beverage, which vary according to the cultivar used. Attempts to plant hops have been made in Brazil, aiming at their large-scale production. However, little is known about the properties inherent to Brazilian cultivars. The objective of this work was to evaluate the antimicrobial activity and the antioxidant activity of hops cultivars produced in Brazil, as well as to determine the chemical composition of α - and β -acids (soft resins) present in their constitution. The contents of total phenols, total flavonoids, antioxidant activity through DPPH and ABTS radicals were analyzed. The antimicrobial activity of hydroethanolic extracts of hops was verified against pathogenic and deteriorating microorganisms. The composition of α and β -acids in the extracts was determined by Ultra Performance Liquid Chromatography (uPLC). The obtained data allowed to visualize the profile of each cultivar, regarding its properties and potential applications. In general, Brazilian cultivars proved to be good sources of phenolic compounds, including flavonoids. In addition, the cultivars produced in the country showed high levels of bitter acids, especially the cultivars Vitória, Columbus and “Canastra”, which presented exceptionally high values of the mentioned compounds, reaching 60% of the dry weight of hop cones. Such characteristics positively influenced the antioxidant and antimicrobial properties of the cultivars, with regard to the activity of hop extracts against the Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus*. Hop extracts also showed antifungal activity, almost completely inhibiting the mycelial growth of the fungus *Byssochlamys nivea*, when in the highest concentration tested ($20 \mu\text{L.mL}^{-1}$). Thus, it was possible to verify the still-unexplored potential of hops cultivars produced in Brazil, whose antioxidant and antimicrobial properties indicate good applicability of this input.

Key-words: Brazilian hops, phenolic compounds, soft resins, antioxidant activity, antimicrobial activity.

1. INTRODUÇÃO

O anseio cada vez maior dos consumidores por alimentos frescos ou produzidos sem a adição de conservantes sintéticos tem induzido à busca por novas estratégias de conservação dos alimentos. Substâncias naturalmente presentes em plantas e que apresentem atividade antioxidante, e/ou, efeito antimicrobiano têm sido alvo de pesquisas visando sua aplicação em matrizes alimentícias como conservantes naturais (KRAMER et al., 2015; RIZZELLO et al., 2017; NIONELLI et al., 2018).

O lúpulo (*Humulus lupulus* L.) é uma planta pertencente à família Cannabaceae muito conhecida por sua utilização como matéria-prima na produção de cervejas. Responsável pelo amargor e aroma característicos da bebida, o lúpulo está ainda associado a propriedades antimicrobianas e antioxidantes, implicando no prolongamento da vida útil do produto (NIONELLI et al., 2018).

Outras aplicações também são inerentes ao lúpulo, como a fabricação de medicamentos naturais para tratamento de casos clínicos de ansiedade, insônia, distúrbios do sono, irritabilidade e problemas digestivos, como dores estomacais e intestinais, bem como sua utilização na composição de cosméticos (DUŠEK et al., 2016).

Estudos têm ainda demonstrado propriedades estrogênicas associadas à planta, aliadas à redução de sintomas relativos à menopausa (AGHAMIRI et al., 2016), e sendo passível de utilização na suplementação alimentar em alguns países (ZANOLI; ZAVATTI, 2008; KRAUSE et al., 2014). Vale ainda citar sua investigação como antimicrobiano frente a patógenos de plantas (BOCQUET et al., 2018a).

Devido ao amplo potencial de aplicação associado a suas propriedades químicas e biológicas, tanto o lúpulo quanto seus metabólitos secundários têm despertado o interesse de um grande número de setores da indústria, a exemplo das indústrias alimentícias que têm incitado seu uso como conservante natural (VILLALOBOS-DELGADO et al. 2015; BOCQUET et al., 2018b).

A composição química do lúpulo depende, primordialmente, da variedade em estudo, além de fatores como a localidade da área de plantio, as condições climáticas inerentes ao período de crescimento das plantas e seu estágio de maturação (RETTBERG; BIENDL; GARBE, 2018).

As flores da planta fêmea são as responsáveis pela formação dos cones de

lúpulo, os quais são compostos por cordões, brácteas, bractéolas e glândulas lupulínicas. Estas últimas estruturas citadas, durante a maturação, produzem metabólitos secundários característicos da planta, como resinas, óleos essenciais e prenilflavonoides (DUŠEK et al., 2016).

A lupulina é um pó resinoso presente nos cones de lúpulo, onde se encontram os óleos essenciais e os α - e β -ácidos, responsáveis pelas características de aroma e sabor em produtos alimentícios, e pela ação antimicrobiana e antioxidante relacionadas à planta. Os óleos essenciais geralmente estão presentes de 0,3 a 3% (m/v) do estróbilo do lúpulo, sendo os terpenos a fração majoritária, correspondendo a cerca de 90% dos seus constituintes. Quanto aos principais α -ácidos, destaque para humulona, cohumulona e adhumulona, tendo como β -ácidos correspondentes, a lupulona, colupulona e adlupulona, respectivamente (OCVIRK; GRDADOLNIK; KOŠIR, 2016; BOCQUET et al., 2018b).

A atividade antimicrobiana dos α - e β -ácidos e seus isômeros têm sido verificada principalmente frente a bactérias Gram-positivas (KRAMER et al., 2015). Outros compostos intrínsecos ao lúpulo, como o flavonoide xanthohumol, apresentam grande espectro de atividade frente a bactérias, vírus, fungos e protozoários (GERHÄUSER, 2005; NATARAJAN et al., 2008). Além disso, quanto ao flavonoide citado, sua atividade antioxidante tem sido comparada à atividade da vitamina E (ORTEGA; SKERGET; KNEZ, 2016).

Uma das principais formas de comercialização do lúpulo é na forma de extrato, o qual pode ser obtido por diferentes técnicas, como por meio da extração por CO₂ supercrítico (KOSTRZEWA; ROJ; DOBRZYNSKA-INGER, 2014; ROJ et al., 2015) ou ainda pela utilização de solventes orgânicos, a exemplo do etanol (ABRAM et al., 2015) e metanol (KEUKELEIRE et al., 2003).

Segundo a *International Hop Growers Convention* (2018), a produção mundial de lúpulo excede 100 mil toneladas ao ano, com Estados Unidos e Alemanha ocupando os primeiros lugares no ranking de maior produção. No Brasil, o lúpulo utilizado nas grandes cervejarias é, ainda, em quase sua totalidade, importado, implicando em elevado custo para esta matéria-prima. Entretanto, após muitas tentativas, a planta tem sido produzida com êxito em pequena escala no país, e sendo destinada à produção de cervejas artesanais (SARNIGHAUSEN; SARNIGHAUSEN; DAL PAI, 2017).

Apesar da exígua produção de lúpulo no Brasil, e da mesma ainda se encontrar em fase de testes, é nítido o potencial de expansão dessa cultura no solo brasileiro, podendo ser visto com bons olhos pela agricultura familiar e uma oportunidade de inserção de um novo produto no agronegócio do país. Devido à diversidade climática e aptidão para o desenvolvimento do setor agrícola, o Brasil poderia vir a suprir no futuro a demanda das cervejarias nacionais, tornando promissora a produção de lúpulo no país (SARNIGHAUSEN; SARNIGHAUSEN; DAL PAI, 2017).

O grande potencial de aplicação do lúpulo nas mais diversas áreas, abrangendo desde a indústria alimentícia à indústria farmacêutica, fica claro por sua composição e propriedades. Além disso, o mercado cervejeiro brasileiro é de suma importância, sendo o lúpulo uma matéria-prima de destaque, porém, caracterizada pelo elevado custo, principalmente devido a seu caráter de importação. A produção brasileira de lúpulo surge como uma alternativa, podendo vir a suprir o mercado com produtos de distintas características e permitindo uma produção inovadora. O lúpulo possui em sua composição uma série de compostos com diferentes funcionalidades e passíveis de aplicação em diversos setores da indústria, tornando-se necessária a investigação de suas propriedades e potencial de aplicação nos diferentes setores, visto à escassez de estudo utilizando as variedades produzidas no Brasil.

1.1. Referências bibliográficas

ABRAM, V.; CEH, B.; VIDMAR, M.; HERCEZI, M.; LAZIC, N.; BUCIK, V.; MOZINA, S. S.; KOSIR, I. J.; KAC, M.; DEMSAR, L.; ULRIH, N. P. A comparison of antioxidant and antimicrobial activity between hop leaves and hop cones. **Industrial Crops and Products**, v. 64, p. 124-134, 215.

AGHAMIRI, V.; MIRGHAFORVAND. M.; MOHAMMAD-ALIZADEH-CHARANDABI, S.; NAZEMIYEH, H. The effect of Hop (*Humulus lupulus* L.) on early menopausal symptoms and hot flashes: a randomized placebo-controlled trial. **Complementary Therapies in Clinical Practice**, v. 23, p. 130–135, 2016.

BOCQUET, L.; RIVIÈREA, C.; DERMONTB, C.; SAMAILLIEA, J.; HILBERTA, J.; HALAMAB, P.; SIAHB, A.; SAHPAZA, S. Antifungal activity of hop extracts and compounds against the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. **Industrial Crops and Products**, v. 122, p. 290-297, 2018a.

BOCQUET, L., SAHPAZ, S., RIVIÈRE, C. **An overview of the antimicrobial properties of hop**. In: MÉRILLON, J.M., RIVIÈRE, C. (Eds.), Natural Antimicrobial

Agents, vol. 9. Springer International Publishing AG, Sustainable Development and Biodiversity book series, p. 31–54, 2018b.

DUŠEK, M.; JANDOVSKÁ, V.; ČERMÁK, P.; MIKYŠKA, A.; OLŠOVSKÁ, J. A novel approach for identification of biologically active phenolic compounds in complex matrices using hybrid quadrupole-orbitrap mass spectrometer: A promising tool for testing antimicrobial activity of hops. **Talanta**, v. 156-157, p. 209-17, 2016.

GERHÄUSER, C. Broad spectrum antiinfective potential of xanthohumol from hop (*Humulus lupulus* L.) in comparison with activities of other hop constituents and xanthohumol metabolites. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 49, p. 827-831, 2005.

Internacional Hop Growers Convention (IHGC). Economic Comission: Summary Reports, France, 2018. Disponível em: < <http://www.hmelj-giz.si/ihgc/doc/2018%20MAY%20IHGC%20EC%20Reports.pdf> > Acesso em : 26 de Agosto de 2018.

KEUKELEIRE, J. D.; OOMS, G.; HEYERICK, A.; ROLDA-RUIZ, I.; BOCKSTAELE, E. V.; KEUKELEIRE, D. D. Formation and Accumulation of r-Acids, â-Acids, Desmethylxanthohumol, and Xanthohumol during Flowering of Hops (*Humulus lupulus* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 4436-4441, 2003.

KOSTRZEWA, D.; ROJ, E.; DOBRZYNSKA-INGER, A. Extraction and fractionation of the hop extract using supercritical CO₂, **Przemysl Chemiczny**, v. 93, p. 1328-1332, 2014.

KRAMER, B., THIELMANN, J., HICKISCH, A., MURANYI, P., WUNDERLICH, J., HAUSER, C. Antimicrobial activity of hop extracts against foodborne pathogens for meat applications. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, p. 648–657, 2015.

KRAUSE, E.; YUAN, Y.; HAJIRAHIMKHAN, A.; DONG, H.; DIETZ, B. M.; NIKOLIC, D.; PAULI, G.F.; BOLTON, J. L.; VAN BREEMEN, R. B. Biological and chemical standardization of a hop (*Humulus lupulus*) botanical dietary supplement. **Biomedical Chromatography**, v. 28, n.6, p. 729–734, 2014.

NATARAJAN, P.; KATTA, S.; ANDREI, I.; BABU ROA AMBATI, V.; LEONIDA, M.; HAAS, G.J. Positive antibacterial co-action between hop (*Humulus lupulus*) constituents and selected antibiotics. **Phytomedicine**, v. 15, p. 194–201, 2008.

NIONELLI, L.; PONTONIO, E.; GOBBETTI, M.; RIZZELLO, C. G. Use of hop extract as antifungal ingredient for bread making and selection of autochthonous resistant starters for sourdough fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 266, p. 173-182, 2018.

OCVIRK, M.; GRDADOLNIK, J.; KOŠIR, 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**. v. 122, p. 452–461. 2016.

ORTEGA, A.B.; SKERGET, M.; KNEZ, Z. Separation of xanthohumol from hop extracts by supercritical fluid chromatography. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 109, p 335-345, 2016.

RETTBERG, N.; BIENDL, 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, n. 1, p. 1-20, 2018.

RIZZELLO, C.G., VERNI, M., BORDIGNON, S., GRAMAGLIA, V., GOBBETTI, M. Hydrolysate from a mixture of legume flours with antifungal activity as an ingredient for prolonging the shelf-life of wheat bread. **Food Microbiology**, v. 64, p. 72–82, 2017.

ROJ, E.; TADIC, V. M.; MISIC, D.; ZIZOVIC, I.; ARSIC, I.; DOBRZYNSKA-INGER, A.; KOSTRZEWA, D. Supercritical carbon dioxide hops extracts with antimicrobial properties. **Open Chemistry**, v. 13, p. 1157-1171, 2015.

SARNIGHAUSEN, P.; SARNIGHAUSEN, V.C.R.; DAL PAI, A. **O Lúpulo e a oportunidade do Agronegócio no Brasil**. 6a Jornada de Iniciação Científica da FATEC de Botucatu, 23 a 27 de outubro de 2017, Botucatu, São Paulo, Brasil.

VILLALOBOS-DELGADO, L.H.; CARO, I.; BLANCO, C.; BODAS, R.; ANDRÉS, S.; GIRÁLDEZ, F. J.; MATEO, J. Effect of the addition of hop (infusion or powder) on the oxidative stability of lean lamb patties during storage. **Small Ruminant Research**, v. 125, p.73–80, 2015.

ZANOLI, P.; ZAVATTI, M. Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v.116, n. 3, p. 383-396, 2008.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a atividade antioxidante e a atividade antimicrobiana dos primeiros cultivares de espécies de lúpulo (*Humulus lupulus* L.) produzidos no Brasil, bem como determinar a composição química dos α - e β -ácidos presentes em extratos hidroetanólicos de lúpulo.

2.2. Objetivos específicos

- a) Obter extratos hidroetanólicos de lúpulo;
- b) Analisar o conteúdo de fenóis totais e flavonoides totais do extrato obtido a partir de lúpulos produzidos no Brasil;
- c) Averiguar a atividade antioxidante dos extratos de lúpulo obtidos;
- d) Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos de lúpulo obtidos;
- e) Determinar os teores de α - e β -ácidos presentes nos extratos hidroetanólicos por *Ultra Performance Liquid Chromatography* (uPLC).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

LÚPULO (*Humulus Lupulus* L.) NA PRODUÇÃO DE ALIMENTOS: UM INSUMO EXCLUSIVO DA INDÚSTRIA CERVEJEIRA?

Tarsila Rodrigues Arruda¹, Patrícia Fontes Pinheiro², Pollyanna Ibrahim Silva¹, Patrícia Campos Bernardes^{1*}

¹Departamento de Engenharia de Alimentos ²Departamento de Química e Física, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo. Alto Universitário, S/N, Guararema, 29500-000, Alegre, Espírito Santo, Brasil.

*Autor Correspondente. Universidade Federal do Espírito Santo, Alto Universitário, S/N, Guararema, 29500-000, Alegre, Espírito Santo, Brasil. E-mail: patricia.bernardes@ufes.br

ABSTRACT

Background

O lúpulo é conhecido mundialmente por sua aplicação na fabricação de cervejas, conferindo principalmente aroma e *flavor* à bebida. Esta planta é rica em compostos bioativos, os quais podem ser extraídos e utilizados também em outros setores da indústria alimentícia, devido a suas propriedades antimicrobiana e antioxidante.

Scope and Approach

Na presente revisão é descrito o potencial uso do lúpulo em diferentes matrizes alimentícias, incluindo a influência da composição dos alimentos nas propriedades da planta. Além disso, métodos convencionais e novas estratégias de extração dos componentes de interesse do lúpulo são colocados em foco, descrevendo sua importância na composição dos extratos de lúpulo.

Key findings and conclusions

Tecnologias emergentes de extração têm mostrado boa aplicabilidade para obtenção dos compostos provenientes do lúpulo, em adição aos já utilizados tradicionalmente. Além da aplicação na produção de cervejas, o lúpulo tem grande potencial para incorporação em outras matrizes alimentícias, como carnes, vegetais e produtos panificados. A natureza dos compostos presentes nos alimentos interfere na atividade do lúpulo, podendo reduzir a efetividade antimicrobiana dos compostos bioativos da planta. A temperatura e o pH também devem ser levados em consideração para utilização do lúpulo e seus componentes em alimentos.

Palavras-chave: Lúpulo; Compostos bioativos; Extração; Purificação; Aplicação em matrizes alimentícias

1. Introdução

O lúpulo (*Humulus lupulus* L.) é reconhecido mundialmente pelo emprego das inflorescências femininas da planta (cones de lúpulo) na fabricação de cerveja, os quais são responsáveis por conferir aroma e *flavor* à bebida e também por aumentar sua estabilidade microbiológica (Kováčová, Lehotay, Úrgeová, Mocák, & Čižmárik, 2011; Lafontaine et al., 2018). Atualmente, cerca de 90% da produção de lúpulo é destinada à indústria cervejeira (Sanz, Torres, Vilariño, & Domínguez, 2019), porém, por suas propriedades biológicas e nutracêuticas, estudos têm evidenciado potencial aplicação em demais setores da indústria (Alonso-Esteban et al., 2019; Maietti et al., 2017; Weber et al., 2019).

Anteriormente a seu emprego na fabricação de cervejas, o lúpulo era utilizado por seu apelo medicinal, estando associado ao tratamento de distúrbios do sono e ansiedade, bem como à melhoria das funções gástricas e à atuação em formulações de remédios por sua atividade antimicrobiana e antifúngica. Além disso, nos últimos anos tem crescido o interesse na funcionalidade da planta, a exemplo da investigação das propriedades estrogênicas e atividade quimiopreventiva contra o câncer (Zanoli & Zavatti, 2008).

A propriedades bioativas do lúpulo estão associadas à presença de metabólitos secundários, cuja composição e quantidade podem ser influenciadas por diversos fatores, tais como variedade, local de plantio, condições climáticas e período de colheita (Abram et al., 2015). Dentre os principais componentes do lúpulo, podem ser mencionados os óleos essenciais, os α e β -ácidos e os compostos fenólicos, os quais são responsáveis por grande parte das características associadas à planta.

Outro fator a ser levado em consideração para posterior aplicação é a tecnologia de extração e purificação dos componentes de interesse. Podem ser obtidos extratos vegetais através de técnicas de extração com solventes orgânicos e fluidos supercríticos, bem como podem ser extraídos os óleos essenciais pela tradicional hidrodestilação. A escolha do processo de extração

é fundamental na determinação da composição do produto final extraído e, conseqüente, da aplicabilidade da mesma (Sanz et al., 2019).

Apesar do número considerável de estudos a respeito da planta mencionada, a maioria dos estudos estão voltados para o papel do lúpulo na produção de cervejas e suas características são alvo de pesquisas associadas a suas propriedades somente quando adicionadas à bebida (Česlová, Holčapek, Fidler, Drštičková, & Lísa, 2009; Lermusieau, Liégeois, & Collin, 2001). Todavia, os constituintes do lúpulo têm demonstrado potencial para aplicação em outras matrizes alimentícias (Kramer et al., 2015; Larson et al., 1996; Nionelli, Pontonio, Gobbetti, & Rizzello, 2018). Em função disso, a presente revisão visa explorar as características do lúpulo que evidenciam seu potencial para diferentes aplicações na indústria de alimentos, abordando também as principais técnicas de extração e purificação associadas a seu emprego, além da convencional utilização como matéria-prima para a indústria cervejeira.

2. Principais compostos bioativos do lúpulo: atividades antioxidante e antimicrobiana

Apesar de estudos explorarem as folhas (Abram et al., 2015) e sementes (Alonso-Esteban et al., 2019) de lúpulo, é nos cones que se encontram grande parte dos compostos de atividade biológica, principalmente α e β -ácidos e seus derivados, polifenóis, e componentes dos óleos essenciais (Steenackers, De Cooman, & De Vos, 2015). A composição e quantidade de tais componentes podem ser alteradas de acordo com a variedade e condições de plantio e colheita da planta, dentre outros fatores.

Os α e β -ácidos, também denominados humulonas e lupulonas, respectivamente, são produzidos nas glândulas lupulínicas da planta. Além disso, são também conhecidas como resinas moles, devido à sua solubilidade em hexano (Hrncic, Spaninger, Kosir, Knez, & Bren, 2019).

Em geral, α -ácidos são reconhecidos por conferir amargor às matrizes alimentícias, como na cerveja, sendo responsáveis por cerca de 2-24% do peso seco do lúpulo. Os principais α -ácidos são cohumulona, humulona e adhumulona, sendo posthumulona e prehumulona compostos minoritários dessa classe. Quando expostos a condições de elevada temperatura (100-130 °C) e pH (8-10), mais de 50% dos α -ácidos são termicamente isomerizados a iso- α -ácidos, os quais são efetivamente compostos de amargor, sendo responsáveis também por conferir certa atividade antimicrobiana, principalmente frente bactérias Gram-positivas (Sanz et al., 2019; Steenackers et al., 2015). O aumento excessivo da temperatura e exposição ao oxigênio após a formação de iso- α -ácidos pode levar à oxidação destes compostos, produzindo odores desagradáveis à matriz alimentícia (Caballero, Blanco, & Porras, 2012).

Os β -ácidos, por sua vez, têm sido estudados quanto à sua atividade antimicrobiana, sendo os principais β -ácidos, lupulona, colupulona e adlupulona, responsáveis por cerca de 10% do peso seco do lúpulo (Larson et al., 1996; Steenackers et al., 2015). Outra característica associada às lupulonas é a conferência de *flavor* à matriz alimentícia a qual são incorporadas, porém, estas substâncias também são susceptíveis à oxidação, podendo originar compostos de degradação indesejáveis (Haseleu, Intelmann, & Hofmann, 2009).

O grupo dos polifenóis encontra-se abundantemente presente em uma grande variedade de plantas. No lúpulo, a fração fenólica corresponde a cerca de 4-14% do seu peso seco, sendo em sua maioria constituída por flavonoides. Apesar das propriedades antioxidantes às quais estão associados, os polifenóis podem sofrer alterações durante o período de estocagem do alimento no qual foi incorporado, modificando suas propriedades e, mais precisamente, fenóis de baixo peso molecular podem conferir características indesejáveis ao produto, como *off-flavor* (Callemien & Collin, 2010).

Em especial, os prenilflavonoides são compostos encontrados em elevada quantidade no lúpulo, quando comparado à demais plantas (Hrncic et al., 2019). Xanthohumol é um exemplo

de flavonoide prenilado exclusivo das inflorescências do lúpulo, constituindo 0,2-1% em peso seco das mesmas. Este flavonoide possui atividade antioxidante, dentre demais atividades biológicas responsáveis por sua característica medicinal. Além disso, sua atividade antimicrobiana vem sendo estudada e tem se mostrado bastante eficaz contra bactérias, fungos e vírus. Sob condições de elevada temperatura e pH, o xanthohumol pode ser convertido em isoxanthohumol, composto também de grande atividade biológica (Bartmańska et al., 2018; Sanz et al., 2019).

Dentre os demais polifenóis presentes no lúpulo que podem evocar aspectos positivos quanto à sua incorporação em diferentes matrizes alimentícias, pode-se citar demais flavonoides como catequinas e flavonóis, bem como ácidos fenólicos, como o ácido ferúlico (Hrncic et al., 2019).

Os óleos essenciais presentes no lúpulo correspondem a 0,5-3% dos cones de lúpulo secos e são responsáveis, em especial, pelo perfil aromático da planta. Os principais compostos dos óleos essenciais de lúpulo são ésteres, aldeídos, cetonas, terpenos e ácidos carboxílico, sendo afetados por altas temperaturas devido à sua volatilidade (Steenackers et al., 2015).

A presença e quantidade desses compostos dependem de muitas variáveis e, além das já mencionadas anteriormente, o método de extração influencia fortemente nas características e aplicação da fração extraída. Logo, é de sumo interesse o conhecimento a respeito dos principais métodos de extração e purificação aplicáveis ao lúpulo para obtenção de produtos passíveis de incorporação em alimentos.

3. Principais métodos de extração e purificação

3.1.Extração com solventes orgânicos e água

A extração de diferentes compostos presentes no lúpulo pode ser realizada através da utilização de solventes orgânicos, tais como metanol, butanol, hexano, etanol, cloreto de

metileno, tricloroetileno e cetonas (Sanz et al., 2019). Neste tipo de extração, dois fatores devem ser primordialmente levados em consideração, o solvente utilizado e a temperatura de extração. Abram et al. (2015) verificaram que ao comparar a extração hidroetanólica (etanol 96%) sob as temperaturas de 30 °C e 60 °C, a maior temperatura testada permitiu a obtenção de extratos com maior conteúdo de compostos fenólicos.

Em geral, solventes orgânicos demonstram-se pouco seletivos, induzindo a extração de polifenóis, gorduras, ceras, pigmentos, α e β -ácidos, bem como materiais não caracterizados (Laws, Bath, Pickett, Ennis, & Wheldon, 1977). Vale mencionar que para incorporação dos extratos obtidos em alimentos, o solvente utilizado deve ser removido após a extração, garantindo a segurança do alimento quanto à sua toxicidade.

Considerando a baixa solubilidade dos α e β -ácidos em água, a utilização deste solvente no processo de extração dos cones de lúpulo não se apresenta como uma alternativa interessante quanto ao produto final obtido. Para a extração aquosa, temperaturas de 50 °C, ou acima, devem ser utilizadas afim de garantir uma maior obtenção de polifenóis e demais compostos bioativos, devendo-se considerar também o tempo utilizado no processo (Patent No. US20170367392A1, 2015).

Em uma breve comparação, os extratos aquosos de lúpulo apresentam menor atividade antioxidante quando comparados com os extratos obtidos a partir da utilização de etanol e dióxido de carbono (CO₂) (Liu, Gu, Tang, & Liu, 2007). Além disso, Kowalczyk, Micha, Cichocka, & Gawlik-dziki (2013) verificaram que extratos aquosos apresentam menor teor de fenólicos totais do que extratos hidroetanólicos (50% etanol) e hidrometanólicos (50% metanol).

Entretanto, alguns estudos apontam que solventes orgânicos sem a adição de água podem ser considerados solventes pobres para a extração de polifenóis. Inclusive, em se tratando de

álcoois, a razão álcool:água é de suma importância para delimitação da eficiência na extração de polifenóis (Formato, Gallo, Ianniello, Montesano, & Naviglio, 2013).

A destilação a vapor comumente utilizada para obtenção de óleos essenciais é responsável pela extração de uma grande gama de compostos voláteis, como ésteres, monoterpenos, e sesquiterpenos, podendo ultrapassar a faixa de 100 compostos identificados na fração extraída. Dentre os principais compostos identificados no óleo essencial de lúpulo, pode-se citar monoterpenos como o β -mirceno e os sesquiterpenos β -carofileno, α -humuleno e β -farneceno (Połec et al., 2019).

3.2. Estratégias alternativas para extração dos componentes do lúpulo

Como mencionado, as características de alguns solventes orgânicos limitam sua utilização no processo de extração, principalmente visando a aplicação do extrato em produtos alimentícios. Implicações para a saúde do consumidor, aspectos ambientais e econômicos, bem como as condições de processamento são alguns fatores que devem ser levantados na escolha do método ideal para obtenção de extratos de lúpulo. Diante deste contexto, algumas técnicas alternativas de extração têm surgido, sendo sua aplicação em cones de lúpulo considerada uma das pioneiras dos ditos “processos verdes” (Sanz et al., 2019).

Neste contexto, a utilização de água pressurizada a 150 °C foi verificada como uma alternativa efetiva para extração de prenilflavonoides de cones de lúpulo, favorecendo ainda a obtenção de extratos ricos em isoxanthohumol (Gil-ramírez et al., 2012).

Outras técnicas já estudadas foram a utilização de micro-ondas para obtenção de óleos essenciais de lúpulo por hidrodestilação, a qual permitiu a extração de óleos ricos em β -mirceno (Tyśkiewicz, Gieysztor, Konkol, Szałas, & Rój, 2018), e a aplicação de ultrassom acoplada a extração com solventes, como água, etanol 70% (v/v), etanol 94% (v/v), éter etílico e glicerol 3,5% (v/v), o que proporcionou um aumento da fração de óleo extraída (Toma, Vinatoru,

Paniwnyk, & Mason, 2001). Além disso, a utilização de campo elétrico pulsado já foi investigada na extração com fluidos supercríticos de óleos e resinas de plantas, incluindo o lúpulo, induzindo a abertura de nanoporos na superfície do material herbáceo, auxiliando a migração e/ou difusão de moléculas intracelulares para o solvente (Patent No. US9981203B2, 2018).

Vale ainda mencionar a respeito do emprego de CO₂ supercrítico (cs-CO₂) no processo de obtenção de extratos de lúpulo, o qual permite a extração de compostos de natureza apolar, como óleos essenciais e α e β -ácidos. Esta técnica permite algumas vantagens tais como a proteção dos produtos contra oxidação, por ser realizada em atmosfera sem a presença de oxigênio, além de condições amenas de processamento, alta velocidade de extração, alta eficiência, baixo impacto ambiental e ausência de resíduos de solvente na fração extraída, gerando produtos finais de maior pureza, quando comparados aos obtidos pela extração com uso de solventes orgânicos (Sanz et al., 2019).

CO₂ supercrítico possui grande seletividade por lupulonas (β -ácidos), permitindo obtenção de extratos com de cerca de 56% a 65% de conteúdo dos mesmos, sendo bastante efetivo para isolamento destes compostos (Formato et al., 2013). Além disso, a utilização de cs-CO₂ no processo de extração de substâncias naturais em pressões superiores (acima de 70 MPa) à convencionalmente utilizada no método de extração supercrítica permite o isolamento de compostos de baixa solubilidade (Hrncic et al., 2019).

Para extração de compostos polares utilizando cs-CO₂, deve-se fazer uso de um solvente auxiliar, também denominado co-solvente, o qual deve ser escolhido de modo a não interferir na seletividade ou comprometer a natureza de processo verde caracterizada nesta extração, sendo mais comum o emprego de álcoois (Sanz et al., 2019). A utilização de etanol como co-solvente produz extratos mais heterogêneos, e a menor seletividade permite maior extração de α -ácidos quando comparado à utilização de cs-CO₂ puro (Formato et al., 2013).

3.3. Técnicas de purificação

Ao contrário da tecnologia de extração com fluido supercrítico, que oferece a possibilidade de isolamento direto dos compostos presentes na fração extraída, a utilização de solventes orgânicos no processo de extração requer uma etapa posterior de purificação e fracionamento dos extratos.

Bocquet et al. (2019) fracionaram extratos preparados por extração com etanol/água (9:1 v/v) utilizando uma separação líquido-líquido com diclorometano e água. Para a purificação de xanthohumol a partir das frações obtidas, os autores fizeram uso de Cromatografia por Partição Centrífuga (CPC) em vários estágios, com um sistema de solventes Arizona, n-heptano/acetato de etila/metanol/água (6:5:6:5 v/v), sendo conferidas através de Cromatografia em Camada Delgada utilizando tolueno/acetato de etila/ácido fórmico (73:18:9 v/v). Demais substâncias, desmethilxanthohumol, humulona, cohumulona, lupulona e colupulona, foram purificados através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Preparativa (CLAEprep), cuja fase móvel foi composta por água (solvente A) e acetonitrila (solvente B). Tal processo permitiu a obtenção de xanthohumol e desmetilxanthohumol com 98% e 95% de pureza, respectivamente.

O isolamento e purificação de xanthohumol também pode ser realizado através de Cromatografia Contracorrente de Alta Velocidade (HSCCC), em um único estágio, a qual demonstrou ser eficiente para obtenção deste composto a partir de lúpulo, visto a pureza acima de 95% da substância purificada. Para este processo, empregou-se um sistema de solventes constituído por n-hexano/acetato de etila/metanol/água (5:5:4:3 v/v) (Chen et al., 2012).

Uma outra proposta para fracionamento e purificação de compostos fenólicos em extratos de lúpulo é a utilização de resinas macroporosas (Patent No. CN101433592A, 2009). Além disso, cs-CO₂ também pode ser utilizado para fracionar extratos etanólicos de lúpulo e promover a separação de prenilflavonoides e outros polifenóis (Sanz et al., 2019).

Extratos obtidos por extração supercrítica ainda permitem a separação de óleos essenciais através de destilação a vácuo ou por evaporação realizada em dois estágios seguida de separação cromatográfica (Biendl et al., 2014).

4. Aplicações em alimentos

De modo geral, o lúpulo é uma planta complexa cuja composição apresenta propriedades de grande interesse à indústria de alimentos. As atividades antioxidante e antimicrobiana dos compostos inerentes aos cones de lúpulo tornam evidente seu potencial de exploração, não somente pela indústria de bebidas, visando sua aplicação na fabricação de cerveja, mas também permitindo sua incorporação em outras matrizes alimentícias. A Tabela 1 evidencia estudos que exploraram a aplicação de lúpulo em alimento

Tabela 1. Exemplos de aplicações de lúpulo em matrizes alimentícias

Matriz alimentícia	Parte da planta utilizada na extração	Composição do extrato	Condições de extração	Concentração	Influência da aplicação do lúpulo	Referência
Salada de repolho	-	29,7% colupulona + 65% lupulona e adlupulona + 8% desoxi- α -ácidos + 7% água + 0,6% iso- α -ácidos	-	1 mg.g ⁻¹	Inibição de <i>Listeria monocytogenes</i>	(Larson et al., 1996)
Leite Desnatado 2% Integral	-	41% β -ácidos + 12% α -ácidos + 47% desoxi- α -ácidos, óleos e ceras lupulínicas	-	0,1 mg.mL ⁻¹ 1 mg.mL ⁻¹ 1 mg.mL ⁻¹	Inibição de <i>Listeria monocytogenes</i>	(Larson et al., 1996)
Queijo Baixo teor de gordura (Cottage) Alto teor de gordura (Camembert)	-	41% β -ácidos + 12% α -ácidos + 47% desoxi- α -ácidos, óleos e ceras lupulínicas	-	0,1 a 3 mg.g ⁻¹ Até 10 mg.g ⁻¹	Inibição de <i>Listeria monocytogenes</i> Não exibiu atividade antimicrobiana frente <i>Listeria monocytogenes</i>	(Larson et al., 1996)

(Cont.)

Pão	Cones de lúpulo	-	Extração com água quente (100 °C)	Adição de 25% de extrato de lúpulo à massa	Atividade antioxidante e aumento da concentração de polifenóis + Atividade antifúngica	(Nionelli et al., 2018)
Produtos cárneos						
Carne marinada (Sistema modelo, pH 7,0, armazenamento a 2 °C)	-	40% β-ácidos em propilenoglicol (Beta Bio 40)	-	1000 mg.L ⁻¹	Redução da contagem inicial de <i>Listeria monocytogenes</i> (2,9 log UFC.mL ⁻¹) após 35 dias	(Kramer et al., 2015)
Carne marinada (Sistema modelo, pH 7,0, armazenamento a 2 °C)	-	65-85% xanthohumol (Xanto-Flav)	-	1000 mg.L ⁻¹	Efeito inibitório frente <i>Listeria monocytogenes</i> , com aumento da fase lag (5 dias)	(Kramer et al., 2015)
Carne marinada (Sistema modelo, pH 5,0, armazenamento a 2 °C)	-	40% β-ácidos em propilenoglicol (Beta Bio 40)	-	250 mg.L ⁻¹	Redução da contagem inicial de <i>Listeria monocytogenes</i> (2,1 log UFC.mL ⁻¹) em 30 dias de armazenamento refrigerado (2 °C)	
				500 mg.L ⁻¹	Redução da contagem inicial de <i>Listeria monocytogenes</i> (>3 log UFC.mL ⁻¹) após 30 dias	
				100 mg.L ⁻¹	Inibição do crescimento de <i>Listeria</i>	

(Cont.)

monocytogenes em até 14 dias

Rissóis de cordeiro

Cones de lúpulo

-

Extração com água quente (100 °C)

Adição de 50 mL do extrato a cada 950 g de carne

Atividade antioxidante, com maior estabilidade da oxidação lipídica e manutenção da cor

(Villalobos-Delgado et al., 2015)

Dispersão dos cones em pó em água a 20 °C

Adição de 2g de lúpulo em pó por kg de carne

Os flavonoides presentes no lúpulo atuam como antioxidantes naturais, fornecendo também suporte a reações sensoriais, podendo ainda ser oxidados dando origem a produtos de escurecimento não enzimático (De Clippeleer, de Rouck, de Cooman, & Aerts, 2010). Além disso, apresentam diferenciada atividade antimicrobiana frente a uma grande variedade de microrganismos, especialmente bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus* (Karabin, Hudcova, Jelinek, & Dostalek, 2014). Quanto aos demais compostos presentes nos cones de lúpulo, os óleos essenciais e os α e β -ácidos além da característica sensorial, conferindo aroma e *flavor* aos alimentos, ainda possuem potencial antimicrobiano e antioxidante.

O lúpulo têm sido estudado quanto à sua atividade antimicrobiana, principalmente frente bactérias Gram-positivas, incluindo espécies dos gêneros *Listeria*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Mycobacterium*, *Streptomyces* e *Bacillus* (Larson et al., 1996; Teuber & Schmalreck, 1973; Zanolli & Zavatti, 2008), além de apresentar atividade frente a fungos como os do gênero *Fusarium* (Bartmańska et al., 2018; Zanolli & Zavatti, 2008).

Um dos entraves da utilização do lúpulo é o *flavor* característico associado a seus compostos, entretanto, Leonida et al. (2018) analisaram a nanoencapsulação de β -ácidos e xanthohumol, culminando em um aumento da atividade antimicrobiana e mascarando o forte sabor amargo.

Abram et al. (2015) avaliaram a atividade de extratos hidroetanólicos de cones de lúpulo frente patógenos de origem alimentar, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, e verificaram extraordinário potencial antimicrobiano frente à bactéria Gram-positiva ($0,0013 \text{ mg.mL}^{-1} < \text{CMI} < 0,0029 \text{ mg.mL}^{-1}$). Além disso, moderada atividade frente *E. coli* O157:H7 foi relatada no estudo citado ($0,19 \text{ mg.mL}^{-1} < \text{CMI} < 0,43 \text{ mg.mL}^{-1}$). Entretanto, algumas pesquisas indicam pouca ou nenhuma atividade frente bactérias Gram-negativas, como o realizado por Langezaal,

Chandra, & Scheffer (1992), o qual analisou óleos essenciais de lúpulo obtidos por hidrodestilação frente a bactéria *E. coli*.

Um fato pertinente à utilização do lúpulo como antimicrobiano em alimentos é seu estudo diretamente na matriz alimentícia. Elevadas concentrações de extratos da planta, assim como seu óleo essencial, podem impactar em *flavors* e aroma indesejáveis às características do alimento.

Em um trabalho realizado por Larson et al. (1996), *Listeria monocytogenes* mostrou-se sensível frente a extratos de lúpulo em meios de cultura, porém, quando testados diretamente em alimentos (queijos e leite), a referida bactéria não foi tão afetada pelos extratos testados, requerendo elevadas quantidades dos extratos em questão. Todavia, o estudo evidenciou o efeito do pH na atividade antimicrobiana dos extratos de lúpulo, a qual sofre influência negativa de valores elevados de pH. Tal fato também foi verificado para atividade antifúngica de extratos aquosos de lúpulo (Nionelli et al., 2018).

A fração lipídica da matriz alimentícia também é um fator de interferência para a efetividade dos extratos de lúpulo, pois alimentos com teor elevado de gordura reduzem a atividade antimicrobiana dos extratos, em virtude do sequestro das resinas moles pela fase hidrofóbica do alimento.

Além dos fatores mencionados, a temperatura também exerce influência em sua atividade inibitória, visto que em temperaturas mais baixas a proporção dos extratos de lúpulo na fase aquosa pode ser maior (Larson et al., 1996). Logo, uma das possíveis aplicações dos extratos de lúpulo consiste em sua incorporação a alimentos de baixo teor de gordura ou refrigerados, como alimentos de origem vegetal minimamente processados.

Outra vertente de interesse para aplicação do lúpulo é sua utilização em alimentos panificados (Irakli, Mygdalia, Chatzopoulou, & Katsantonis, 2019; Nionelli et al., 2018). A adição de extratos aquosos de lúpulo na produção de pães promove um aumento da

concentração de fenóis totais do produto, inferindo em um aumento do efeito antioxidante no produto auxiliando em sua conservação. Além disso, a adição de lúpulo à formulação de pães pode promover alterações na coloração da crosta, tornando-a mais escura, bem como incorporando amargor e sabor herbáceo ao produto final. Vale mencionar ainda que a adição do extrato de lúpulo à panificação pode influenciar na vida útil dos pães, evitando o crescimento de fungos por pelo menos 14 dias após sua produção, quando comparado com pães elaborados sem a adição de propionato de cálcio (Nionelli et al., 2018).

Em relação a utilização de lúpulo em matrizes cárneas, Kramer et al. (2015) verificaram o efeito de extratos comerciais de lúpulo contendo α -ácidos, β -ácidos e xanthohumol frente bactérias de origem alimentar e sua potencial aplicação em sistemas modelo de carne marinada. Os extratos de lúpulo mostraram-se promissores para atuar no aumento da vida útil e seguridade microbiológica de produtos cárneos, em especial extratos ricos em β -ácidos, os quais promoveram a inibição do crescimento do patógeno *L. monocytogenes* em até 14 dias de armazenamento a 2 °C.

Outro estudo, conduzido por Villalobos-Delgado et al. (2015), analisou a incorporação de lúpulo (2 mg.kg⁻¹) em rissóis de cordeiro, comparando a utilização da planta nas formas de pó e infusão, e ainda sua influência durante o armazenamento dos produtos. Apesar das preparações conduzidas com adição de lúpulo terem afetado sutilmente, de forma negativa, a aceitação do produto, os autores verificaram que o lúpulo exibiu atividade antioxidante significativa, reduzindo a oxidação de lipídios e proteínas do produto cárneo durante o armazenamento refrigerado, principalmente considerando a utilização da planta em pó.

Algumas patentes já verificaram a eficácia da utilização de extratos de lúpulo em alimentos, como produtos cárneos crus e processados, queijos (Patent No. US 2004/0175480 A1, 2004) peixes (Patent No. US 7.550,162 B2, 2009), produtos de confeitaria (Patent No. RU2357417C2, 2009) e alimentos embalados a vácuo (Patent No. US 2004/0018284 A1, 2004).

5. Conclusões e perspectivas futuras

Diferentes técnicas de extração e purificação podem ser utilizadas para obtenção de produtos de lúpulo com características distintas. A extração com solventes necessita de uma etapa posterior de remoção do solvente utilizado afim de possibilitar sua aplicação sem riscos à saúde, diferentemente da extração com dióxido de carbono supercrítico que torna esta etapa desnecessária. Industrialmente, a extração com etanol também é muito explorada, devido às suas características e baixa toxicidade comparado aos demais solventes. A presença de resinas moles (α - e β -ácidos), assim como compostos fenólicos, a exemplo de xanthohumol, conferem propriedades antioxidante e antimicrobiana ao lúpulo, as quais ainda são pouco exploradas pela indústria alimentícia. Quanto à sua atividade antimicrobiana, o lúpulo tem se demonstrado bastante eficaz frente bactérias Gram-positivas. Deve-se mencionar que a composição do alimento interfere diretamente nas propriedades do lúpulo, a exemplo do pH, temperatura e teor de gordura, indicando um maior potencial de aplicação em matrizes alimentícias com baixa fração lipídica, pH baixo e armazenado sob baixas temperaturas, como produtos de origem vegetal minimamente processados. O lúpulo pode ainda ser aplicado em produtos cárneos e panificados, atuando como aliado na conservação desses alimentos. Logo, é evidente o potencial de aplicação do lúpulo em alimentos, sendo necessários maiores estudos a respeito da interação entre seus compostos e os componentes dos alimentos.

Instituições de fomento: Os autores agradecem ao incentivo fornecido pela CAPES e CNPQ ao desenvolvimento do presente estudo.

6. Referências

- Abram, V., Čeh, B., Vidmar, M., Hercezi, M., Lazić, N., Bucik, V., ... Poklar Ulrih, N. (2015). A comparison of antioxidant and antimicrobial activity between hop leaves and hop cones. *Industrial Crops and Products*, 64, 124–134. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.11.008>
- Alonso-Esteban, J. I., Pinela, J., Barros, L., Ćirić, A., Soković, M., Calhelha, R. C., ... Ferreira, I. C. F. R. (2019). Phenolic composition and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic properties of hop (*Humulus lupulus* L.) Seeds. *Industrial Crops and Products*, 134(April), 154–159. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.04.001>
- Arita, T., Hidaka, K., & Shibuya, K. (2015). *Patent No. US20170367392A1*. United States.
- Bartmańska, A., Wałęcka-Zacharska, E., Tronina, T., Popłoński, J., Sordon, S., Brzezowska, E., ... Huszcza, E. (2018). Antimicrobial properties of spent hops extracts, flavonoids isolated therefrom, and their derivatives. *Molecules*, 23(8), 1–12. <https://doi.org/10.3390/molecules23082059>
- Bassanetti, I., Carcelli, M., Buschini, A., Montalbano, S., Leonardi, G., Pelagatti, P., ... Rogolino, D. (2017). Investigation of antibacterial activity of new classes of essential oils. *Food Control*, 73(Part B), 606–612. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.09.010>
- Berdahl, D. R., Reynhout, G. S., & Schulze, M. H. (2009). *Patent No. US 7.550,162 B2*. United States.
- Bhattacharya, S., Virani, S., Zavro, M., & Haas, G. J. (2003). Inhibition of *Streptococcus mutans* and other oral *Streptococci* by hop (*Humulus lupulus* L.) constituents. *Economic Botany*, 57(1), 118–125. [https://doi.org/10.1663/0013-0001\(2003\)057\[0118:IOSMAO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1663/0013-0001(2003)057[0118:IOSMAO]2.0.CO;2)
- Biendl, M., Engelhard, B., Forster, A., Gahr, A., Lutz, A., Mitter, W., ... Schönberger, C. (2014). *Hops: their cultivation, composition and usage*. Nuremberg, Germany: Fachverlag Hans Carl.
- Bierne, H., & Cossart, P. (2007). *Listeria monocytogenes* surface proteins: from genome predictions to function. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(2), 377–397. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00039-06>
- Bocquet, L., Rivière, C., Dermont, C., Samaillie, J., Hilbert, J. L., Halama, P., ... Sahpaz, S. (2018). Antifungal activity of hop extracts and compounds against the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Industrial Crops and Products*, 122(February), 290–297. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.061>
- Bocquet, L., Sahpaz, S., Bonneau, N., Beaufay, C., Mahieux, S., Samaillie, J., ... Rivière, C. (2019). Phenolic compounds from *Humulus lupulus* as natural antimicrobial products: New weapons in the fight against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, *Leishmania mexicana* and *Trypanosoma brucei* strains. *Molecules*, 24(6), 1024–1050. <https://doi.org/10.3390/molecules24061024>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, 28(1), 25–30. <https://doi.org/10.3906/sag-1411-35>

- Buxiang, S., Lingzhi, T., Jiang, D., Wei, L., & Lihuang, Q. (2009). *Patent No. CN101433592A*. China.
- Caballero, I., Blanco, C. A., & Porras, M. (2012). Iso- α -acids, bitterness and loss of beer quality during storage. *Trends in Food Science and Technology*, 26(1), 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.01.001>
- Cabanes, D., Dehoux, P., Dussurget, O., Frangeul, L., & Cossart, P. (2002). Surface proteins and the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes*. *Trends in Microbiology*, 10(5), 238–245. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(02\)02342-9](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(02)02342-9)
- Callemien, D., & Collin, S. (2010). Structure, organoleptic properties, quantification methods, and stability of phenolic compounds in beer-A review. *Food Reviews International*, 26(1), 1–84. <https://doi.org/10.1080/87559120903157954>
- Čeh, B., Kač, M., Košir, I. J., & Abram, V. (2007). Relationships between xanthohumol and polyphenol content in hop leaves and hop cones with regard to water supply and cultivar. *International Journal of Molecular Sciences*, 8(9), 989–1000. <https://doi.org/10.3390/i8090989>
- Česlová, L., Holčapek, M., Fidler, M., Drštičková, J., & Lísa, M. (2009). Characterization of prenylflavonoids and hop bitter acids in various classes of Czech beers and hop extracts using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216(43), 7249–7257. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.09.022>
- Chen, Q., Fu, M., Chen, M., Liu, J., Liu, X., He, G., & Pu, S. (2012). Preparative isolation and purification of xanthohumol from hops (*Humulus lupulus* L.) by high-speed counter-current chromatography. *Food Chemistry*, 132(1), 619–623. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.10.098>
- David Forest Kuethe, W., & Karman, V. D. (2004). *Patent No. US 2004/0018284 A1*. United States.
- de Clippeleer, J., de Rouck, G., de Cooman, L., & Aerts, G. (2010). Influence of the hopping technology on the storage-induced appearance of staling aldehydes in beer. *Journal of the Institute of Brewing*, 116(4), 381–398. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2010.tb00789.x>
- De Keukeleire, J., Ooms, G., Heyerick, A., Roldan-Ruiz, I., Van Bockstaele, E., & De Keukeleire, D. (2003). Formation and accumulation of α -acids, β -acids, desmethylxanthohumol, and xanthohumol during flowering of hops (*Humulus lupulus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(15), 4436–4441. <https://doi.org/10.1021/jf034263z>
- Deans, S. G., & Ritchie, G. (1987). Antibacterial properties of plant essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 5(2), 165–180. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(87\)90034-1](https://doi.org/10.1016/0168-1605(87)90034-1)
- Delcour, A. H. (2010). Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1794(5), 808–816. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.11.005>
- Donnenberg, M. S. (2015). Enterobacteriaceae. In *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases* (Vol. 2, pp. 2503–2517). <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-4801-3.00220-4>

- Dušek, M., Jandovská, V., Čermák, P., Mikyška, A., & Olšovská, J. (2016). A novel approach for identification of biologically active phenolic compounds in complex matrices using hybrid quadrupole-orbitrap mass spectrometer: A promising tool for testing antimicrobial activity of hops. *Talanta*, *156–157*, 209–217. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.05.018>
- Engelson, M., Solberg, M., & Karmas, E. (1980). Antimycotic properties of hop extract in reduced water activity media. *Journal of Food Science*, *45*, 1175–1178. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1980.tb06514.x>
- Fattouch, S., Caboni, P., Coroneo, V., Tuberoso, C. I. G., Angioni, A., Dessi, S., ... Cabras, P. (2007). Antimicrobial activity of tunisian quince (*Cydonia oblonga* Miller) pulp and peel polyphenols extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(3), 963–969. <https://doi.org/10.1021/jf062614e>
- Fedorovich, R. J., Anatol'evn, S. N., Olegovna, K. J., & Alekseevna, C. N. (2009). *Patent No. RU2357417C2*. Russia.
- Formato, A., Gallo, M., Ianniello, D., Montesano, D., & Naviglio, D. (2013). The Journal of Supercritical Fluids Supercritical fluid extraction of α - and β -acids from hops compared to cyclically pressurized solid – liquid extraction. *The Journal of Supercritical Fluids*, *84*, 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2013.09.021>
- Gil-ramírez, A., Antonio, J., Arranz, E., Ruíz-rodríguez, A., Reglero, G., Ibáñez, E., & Marín, F. R. (2012). Highly isoxanthohumol enriched hop extract obtained by pressurized hot water extraction (PHWE): Chemical and functional characterization. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *16*, 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2012.04.006>
- Gomes, F. M. S., da Cunha Xavier, J., dos Santos, J. F. S., de Matos, Y. M. L. S., Tintino, S. R., de Freitas, T. S., & Coutinho, H. D. M. (2018). Evaluation of antibacterial and modifying action of catechin antibiotics in resistant strains. *Microbial Pathogenesis*, *115*(2018), 175–178. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.12.058>
- Gow, N. A. R., Latge, J., Munro, C. A., De Groot, P. W. J., Hellingwerf, K. J., Klis, F. M., ... Gil, C. (2017). The fungal cell wall: structure, biosynthesis, and function. *Microbiology Spectrum*, *5*(3), 3341–3354. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0035-2016.Correspondence>
- Haseleu, G., Intelmann, D., & Hofmann, T. (2009). Structure determination and sensory evaluation of novel bitter compounds formed from β -acids of hop (*Humulus lupulus* L.) upon wort boiling. *Food Chemistry*, *116*(1), 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.008>
- Hrcic, M. K., Spaninger, E., Kosir, I. J., Knez, Z., & Bren, U. (2019). Hop compounds : extraction techniques, chemical analyses, antioxidative, antimicrobial, and anticarcinogenic effects. *Nutrients*, *11*(257), 1–37. <https://doi.org/10.3390/nu11020257>
- Irakli, M., Mygdalia, A., Chatzopoulou, P., & Katsantonis, D. (2019). Impact of the combination of sourdough fermentation and hop extract addition on baking properties, antioxidant capacity and phenolics bioaccessibility of rice bran-enhanced bread. *Food Chemistry*, *285*, 231–239. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.145>
- Jurková, M., Čejka, P., & Olšovská, J. (2012). New trends in liquid chromatography and their

- utilization in analysis of beer and brewery raw materials. Part 3. Comparison of HPLC and UHPLC determination of α - and β -acids. *Kvasny Prumysl*, 58(6), 166–170. <https://doi.org/10.18832/kp2012016>
- Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., & Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10), 3954–3962. <https://doi.org/10.1021/jf9901461>
- Karabin, M., Hudcova, T., Jelinek, L., & Dostalek, P. (2014). Biotransformations and biological activities of hop flavonoids. In *Biotechnology Advances* (Vol. 33). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.02.009>
- Kim, D. O., Jeong, S. W., & Lee, C. Y. (2003). Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry*, 81(3), 321–326. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00423-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00423-5)
- Kováčová, J., Lehotay, J., Úrgeová, E., Mocák, J., & Čižmárik, J. (2011). Determination of selected flavonoids in hop extract by HPLC. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 34(5), 329–340. <https://doi.org/10.1080/10826076.2011.551596>
- Kowalczyk, D., Micha, Ś., Cichočka, J., & Gawlik-dziki, U. (2013). The phenolic content and antioxidant activity of the aqueous and hydroalcoholic extracts of hops and their pellets. *Journal of the Institute of Brewing*, 119(3), 103–110. <https://doi.org/10.1002/jib.73>
- Kramer, B., Thielmann, J., Hickisch, A., Muranyi, P., Wunderlich, J., & Hauser, C. (2015). Antimicrobial activity of hop extracts against foodborne pathogens for meat applications. *Journal of Applied Microbiology*, 118(3), 648–657. <https://doi.org/10.1111/jam.12717>
- Lafontaine, S., Varnum, S., Roland, A., Delpech, S., Dagan, L., Vollmer, D., ... Shellhammer, T. (2018). Impact of harvest maturity on the aroma characteristics and chemistry of Cascade hops used for dry-hopping. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.148>
- Langezaal, C. R., Chandra, A., & Scheffer, J. J. C. (1992). Antimicrobial screening of essential oils and extracts of some *Humulus lupulus* L. cultivars. *Pharmaceutisch Weekblad Scientific Edition*, 14(6), 353–356. <https://doi.org/10.1007/BF01970171>
- Larson, A. E., Yu, R. R. Y., Lee, O. A., Price, S., Haas, G. J., & Johnson, E. A. (1996). Antimicrobial activity of hop extracts against *Listeria monocytogenes* in media and in food. *International Journal of Food Microbiology*, 33(2–3), 195–207. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)01155-5](https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)01155-5)
- Laws, D. R. J., Bath, N. A., Pickett, J. A., Ennis, C. S., & Wheldon, A. G. (1977). Preparation of hop extracts without using organic solvents. *Journal of the Institute of Brewing*, 83, 39–40.
- Leonida, M. D., Belbekhouche, S., Benzecry, A., Peddineni, M., Suria, A., & Carbonnier, B. (2018). Antibacterial hop extracts encapsulated in nanochitosan matrices. *International Journal of Biological Macromolecules*, 120, 1335–1343. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.003>
- Lermusieau, G., Liégeois, C., & Collin, S. (2001). Reducing power of hop cultivars and beer ageing. *Food Chemistry*, 72(4), 413–418. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00247-8](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00247-8)

- Lim, K., & Mustapha, A. (2007). Inhibition of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* on sliced roast beef by cetylpyridinium chloride and acidified sodium chlorite. *Food Microbiology*, 24, 89–94. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.04.005>
- Liu, Y., Gu, X. H., Tang, J., & Liu, K. (2007). Antioxidant activities of hops (*Humulus lupulus*) and their products. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 65(2), 116–121. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2007-0211-01>
- Machado, J. C., Faria, M. A., Melo, A., Martins, Z. E., & Ferreira, I. M. P. L. V. O. (2019). Modeling of α -acids and xanthohumol extraction in dry-hopped beers. *Food Chemistry*, 278, 216–222. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.050>
- Maietti, A., Brighenti, V., Bonetti, G., Tedeschi, P., Prencipe, F. P., Benvenuti, S., ... Pellati, F. (2017). Metabolite profiling of flavonols and in vitro antioxidant activity of young shoots of wild *Humulus lupulus* L. (hop). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 142, 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.04.043>
- Nionelli, L., Pontonio, E., Gobetti, M., & Rizzello, C. G. (2018). Use of hop extract as antifungal ingredient for bread making and selection of autochthonous resistant starters for sourdough fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 266(May 2017), 173–182. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.12.002>
- Pires, T. C., & Piccoli, R. H. (2012). Inhibitory effect of essential oils from the genus *Citrus* on the microorganisms growth. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, 71(2), 378–385.
- Połeć, K., Barnaś, B., Kowalska, M., Dymek, M., Rachwalik, R., Sikora, E., ... Hąc-Wydro, K. (2019). The influence of the essential oil extracted from hops on monolayers and bilayers imitating plant pathogen bacteria membranes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 173, 672–680. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.10.047>
- Re, R., Pellegrini, N., Protehente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9/10), 1231–1237.
- Rozalski, M., Micota, B., Sadowska, B., Stochmal, A., Jedrejek, D., Wieckowska-Szakiel, M., & Rozalska, B. (2013). Antiadherent and antibiofilm activity of *Humulus lupulus* L. derived products: New pharmacological properties. *BioMed Research International*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/101089>
- Sakai, K., Koyama, N., Fukuda, T., Mori, Y., Onaka, H., & Tomoda, H. (2012). Search method for inhibitors of staphyloxanthin production by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 35(1), 48–53. <https://doi.org/10.1248/bpb.35.48>
- Sanz, V., Torres, M. D., Vilariño, J. M. L., & Domínguez, H. (2019). What is new on the hop extraction? *Trends in Food Science & Technology*, 93, 12–22. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.08.018>
- Schurr, B. C., Hahne, H., Kuster, B., Behr, J., & Vogel, R. F. (2015). Molecular mechanisms behind the antimicrobial activity of hop iso- α -acids in *Lactobacillus brevis*. *Food Microbiology*, 46, 553–563. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.09.017>
- Seman, D. L., Hirschev, J. A., L., A., & Barney, M. (2004). *Patent No. US 2004/0175480 A1*. United States.

- Shimwell, B. J. L. (1937). On the relation between the staining properties of bacteria and their reaction towards hop antiseptic. *Journal of the Institute of Brewing*, 43, 191–195. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1937.tb05727.x>
- Shuja, A. (2018). *Patent No. US9981203B2*. United States.
- Silva, V., Igrejas, G., Falco, V., Santos, T. P., Torres, C., Oliveira, A. M. P., ... Poeta, P. (2018). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of phenolic compounds extracted from wine industry by-products. *Food Control*, 92, 516–522. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.05.031>
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144–158.
- Steenackers, B., De Cooman, L., & De Vos, D. (2015). Chemical transformations of characteristic hop secondary metabolites in relation to beer properties and the brewing process: A review. *Food Chemistry*, 172, 742–756. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.139>
- Szewczyk, K., Zidorn, C., Biernasiuk, A., Komsta, Ł., & Granica, S. (2016). Polyphenols from *Impatiens* (Balsaminaceae) and their antioxidant and antimicrobial activities. *Industrial Crops and Products*, 86, 262–272. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.03.053>
- Taylor, P., Mizobuchi, S., & Sato, Y. (1985). Antifungal activities of hop bitter resins and related compounds. *Agricultural and Biological Chemistry*, 49, 399–403. <https://doi.org/10.1080/00021369.1985.10866749>
- Teuber, M., & Schmalreck, A. F. (1973). Membrane leakage in *Bacillus subtilis* 168 induced by the hop constituents lupulone, humulone, isohumulone and humulinic acid. *Archiv Für Mikrobiologie*, 94, 159–171. <https://doi.org/10.1007/BF00416690>
- Toma, M., Vinatoru, M., Paniwnyk, L., & Mason, T. J. (2001). Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8(2), 137–142. [https://doi.org/10.1016/S1350-4177\(00\)00033-X](https://doi.org/10.1016/S1350-4177(00)00033-X)
- Tyśkiewicz, K., Gieysztor, R., Konkol, M., Szalas, J., & Rój, E. (2018). Essential oils from *Humulus lupulus* scCO₂ extract by hydrodistillation and microwave-assisted hydrodistillation. *Molecules*, 23, 2866. <https://doi.org/10.3390/molecules23112866>
- Villalobos-Delgado, L. H., Caro, I., Blanco, C., Bodas, R., Andrés, S., Giráldez, F. J., & Mateo, J. (2015). Effect of the addition of hop (infusion or powder) on the oxidative stability of lean lamb patties during storage. *Small Ruminant Research*, 125, 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.02.008>
- Weber, N., Biehler, K., Schwabe, K., Haarhaus, B., Quirin, K. W., Frank, U., ... Wölflé, U. (2019). Hop extract acts as an antioxidant with antimicrobial effects against *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus aureus*. *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules24020223>
- Wiener, M. C., & Horanyi, P. S. (2011). How hydrophobic molecules traverse the outer membranes of Gram-negative bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(27), 10929–10930. <https://doi.org/10.1073/pnas.1106927108>

- Yam, T. ., Shah, S., & Hamilton-Miller, J. M. . (2006). Microbiological activity of whole and fractionated crude extracts of tea (*Camellia sinensis*), and of tea components. *FEMS Microbiology Letters*, *152*(1), 169–174. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb10424.x>
- Zanoli, P., & Zavatti, M. (2008). Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. *Journal of Ethnopharmacology*, *116*, 383–396. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.01.011>

4. ARTIGO ORIGINAL

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DE LÚPULOS (*Humulus lupulus* L.) PRODUZIDOS NO BRASIL: UMA NOVA PERSPECTIVA

Tarsila Rodrigues Arruda¹, Patrícia Fontes Pinheiro², Pollyanna Ibrahim Silva¹, Patrícia Campos Bernardes^{1*}

¹Departamento de Engenharia de Alimentos ²Departamento de Química e Física, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo. Alto Universitário, S/N, Guararema, 29500-000, Alegre, Espírito Santo, Brasil.

***Autor Correspondente:** Prof.^a Dra. Patrícia Campos Bernardes, Departamento de Engenharia de Alimentos

Universidade Federal do Espírito Santo, Alto Universitário, S/N, Guararema, 29500-000, Alegre, Espírito Santo, Brasil.

E-mail: patricia.bernardes@ufes.br

Abstract

O lúpulo é uma planta associada a uma elevada gama de propriedades biológicas. O potencial antioxidante e antimicrobiano dos cones de lúpulo é justificado por sua composição química, rica em compostos fenólicos e resinas moles. Entretanto, vários fatores influenciam a presença e quantidade dos compostos inerentes ao lúpulo, tais como a cultivar, o local e as condições de plantio. Recentemente, o cultivo de lúpulo no Brasil tem despertado interesse e, apesar do clima tropical, tem sido possível obter lúpulo no referido país. O presente estudo objetivou analisar a composição química e verificar o potencial antioxidante e antimicrobiano de lúpulos cultivados no Brasil. Foram verificados os teores de compostos fenólicos e flavonoides, além da atividade antioxidante através de ensaios com os radicais ABTS e DPPH. A atividade antimicrobiana foi avaliada frente bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bem como foi testada a atividade antifúngica dos extratos de lúpulo. O teor de lupulonas e humulonas foi analisado através de uPLC (*Ultra Performance Liquid Chromatography*). Os lúpulos produzidos no Brasil se mostraram boas fontes de flavonoides (5,72 – 12,82 mg CE.g⁻¹), apresentando elevado conteúdo de compostos fenólicos, em especial uma cultivar denominada “Canastra” (35, 1 mg GAE.g⁻¹). Foi verificado grande potencial antioxidante e antimicrobiano para as cultivares brasileiras. Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas apresentaram susceptibilidade aos extratos hidroetanólicos de lúpulo, com o maior efeito exibido frente *Staphylococcus aureus* para todas as cultivares. Atividade antifúngica foi verificada frente *Byssochlamys nivea*, com decaimento do diâmetro micelial conforme aumento da concentração dos extratos e inibição significativa do crescimento fúngico na maior concentração avaliada (20 µL.mL⁻¹). Foi constatado elevado teor de α e β ácidos nas cultivares brasileiras, com destaque para as variedades Vitória, Columbus e “Canastra”, cujo conteúdo de resinas moles chegou a alcançar aproximadamente 60% (m.m⁻¹) dos cones de lúpulo. Tais características evidenciam a potencial aplicação das

variedades brasileiras como matéria-prima das indústrias farmacêutica e alimentícia, em especial na fabricação de cervejas.

Palavras-chave: lúpulo, cultivares brasileiras, compostos fenólicos, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana, resinas moles

1. Introdução

O lúpulo (*Humulus lupulus* L.) é uma planta pertencente à família Cannabaceae, cujo cultivo está associado predominantemente à sua utilização como matéria-prima na fabricação de cervejas. Dos cones de lúpulo são oriundas grande parte das substâncias associadas às propriedades biológicas da planta (Zanoli & Zavatti, 2008).

De acordo com a presença e proporções dos compostos químicos presentes no lúpulo, uma série de propriedades de interesse podem ser verificadas em maior ou menor intensidade, a exemplo dos potenciais antioxidante, antimicrobiano e anti-inflamatório, além das propriedades antimutagênica, antialérgica, neuroprotetora e estrogênica (Hrncic et al., 2019; Sanz et al., 2019).

A composição química do lúpulo varia consideravelmente com diversos fatores, a mencionar a cultivar, o local de plantio, estágio de maturação e as condições climáticas durante seu crescimento (Abram et al., 2015). Entre os compostos inerentes ao lúpulo podem ser mencionados os fenóis, óleos essenciais, α e β -ácidos.

A fração fenólica do lúpulo (4-14% do lúpulo seco) é constituída principalmente de flavonoides, sendo alguns exclusivos às inflorescências da planta, como o xanthohumol (Sanz et al., 2019). Os polifenóis exibem uma grande variedade de propriedades fisiológicas, evidenciando inúmeras possíveis aplicações, em especial a utilização como conservantes naturais (Hrncic et al., 2019). Em função do potencial antimicrobiano e antioxidante, alguns estudos têm investigado os benefícios da referida planta à produção de alimentos, a exemplo de matrizes cárneas (Kramer et al., 2015), queijos (Larson et al., 1996) e panificados (Nionelli et al., 2018).

Os α -ácidos (humulonas) e β -ácidos (lupulonas) representam grande parte do peso seco dos cones de lúpulo e estão associados às características de *flavor* e aroma da cerveja, além de evidenciarem participação em importantes propriedades inerentes à planta, a exemplo do

potencial antimicrobiano (Sanz et al., 2019). Os α -ácidos majoritários são cohumulona, humulona e adhumulona, os quais sob condições de elevada temperatura são isomerizados a iso- α -ácidos, principais agentes de amargor da cerveja, apresentando também atividade bactericida, principalmente frente bactérias Gram-positivas (Kramer et al., 2015; Steenackers et al., 2015). Os β -ácidos majoritários, por sua vez, são colupulona, lupulona e adlupulona, constituindo cerca de 10% do peso seco do lúpulo e exercendo papel potencial no aroma e atividade antimicrobiana característicos da planta (Formato et al., 2013; Larson et al., 1996).

A fim de se obter uma grande gama de compostos provenientes do lúpulo, métodos de extração tradicionais e tecnologias emergentes são utilizadas. Vale mencionar que as técnicas de extração e purificação utilizadas para obtenção dos extratos constituem variáveis de interferência na composição química dos extratos obtidos. Dentre os métodos de extração comumente observados em práticas industriais está o emprego de solventes orgânicos, como o etanol (Hrcic et al., 2019).

No Brasil, o lúpulo é, em quase sua totalidade, oriundo de importação, resultando em um alto custo da matéria-prima e conseqüentemente do produto final no qual é utilizado como insumo. Apesar das tentativas recentes de adaptação da espécie no país, visando seu plantio em larga escala, pouco se tem conhecimento das propriedades químicas e biológicas dos lúpulos produzidos no Brasil. Em virtude da ausência de informação a respeito dos lúpulos cultivados no Brasil, o objetivo principal deste trabalho foi estabelecer a composição química e averiguar o potencial antioxidante e antimicrobiano desta matéria-prima.

Para este propósito, foram obtidos extratos hidroetanólicos dos cones de lúpulo de nove variedades produzidas no Brasil. Analisou-se o teor de fenólicos e flavonoides totais, bem como as atividades antioxidante e antimicrobiana dos extratos obtidos. Além disso, foram identificados e quantificados os α e β -ácidos majoritários presentes nos extratos por análise em uPLC.

2. Material e Métodos

2.1. Cultivares de Lúpulo

O material vegetal utilizado consistiu em cones de lúpulo *in natura* de nove variedades cultivadas no Brasil: Spalt, Saaz, Vitória, Cascade, Mantiqueira, Columbus, Brasylijsk, “Canastra” e Halertau Miltfruh. As cultivares são inerentes à safra de 2017/2018, oriundas de Bom Jardim (região de Nova Friburgo), Rio de Janeiro (22° 9’ 36” S, 42° 26’ 12” W). As amostras, previamente embaladas à vácuo, foram armazenadas a -12 °C até que fossem obtidos os extratos. Além das cultivares brasileiras, a variedade comercial Premiant (República Tcheca), também foi analisada.

2.2. Preparo dos extratos

As amostras de lúpulo foram maceradas com auxílio de um pistilo, sendo 500 mg do macerado obtido homogeneizado com 25 mL de etanol 96% (v/v). A utilização do etanol como solvente justifica-se pela simulação de práticas industriais realizadas para obtenção de extratos de lúpulo. A extração foi conduzida a 60 °C por 24 h em banho maria. Os extratos foram resfriados à temperatura ambiente e então centrifugados (Excelsa II, FANEM, Brasil) a 2470 x g, por 10 min. O sobrenadante obtido foi armazenado a -12 °C até o momento das análises (ABRAM et al., 2015).

2.3. Determinação do teor de fenólicos totais

O teor de fenóis totais foi determinado através de método espectrofotométrico, utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu, conforme metodologia descrita por Singleton & Rossi (1965), com modificações. Uma alíquota de 0,6 mL de cada extrato diluído com etanol (1:5 v/v) foi adicionada de 3,0 mL de reagente Folin-Ciocalteu, 1:10 (v/v). Após 3 minutos de repouso no escuro, foram adicionados 2,4 mL de uma solução saturada de Na₂CO₃. A mistura foi mantida

novamente em repouso por 1 hora, para então ser lida a absorbância a 760 nm em espectrofotômetro (Termo Fisher Scientific, EVO300 PC, EUA). O conteúdo fenólico total foi determinado utilizando uma curva padrão de ácido gálico (0 - 170 mg.L⁻¹). Os resultados foram expressos em mg de equivalente de ácido gálico por grama de amostra seca (mg.GAE.g⁻¹).

2.4. Determinação do teor de flavonoides totais

O conteúdo de flavonoides totais foi determinado conforme metodologia espectrofotométrica descrita por Kim, Jeong & Lee (2003), com modificações. Para tanto, 0,5 mL de cada extrato diluído com etanol (1:5 v/v) foi adicionado de 2 mL de água destilada e 0,15 mL de nitrito de sódio a 5% (v/v). Após 5 minutos, 0,15 mL de cloreto de alumínio 10% (v/v) foi adicionado à mistura, sendo um minuto depois adicionada de 1 mL de solução de hidróxido de sódio 1M. Ao final da análise, 1,2 mL de água destilada foi incorporada à mistura, sendo o conteúdo agitado por 30 segundos. A leitura foi realizada a 510 nanômetros. O teor de flavonoides totais foi determinado com o auxílio de uma curva padrão de catequina (0 - 140 mg.L⁻¹). O branco foi obtido com o preparo da mesma solução descrita anteriormente, sem a adição do AlCl₃. Os resultados foram expressos em mg de equivalente de catequina por grama de amostra seca (mgCE.g⁻¹).

2.5. Determinação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos extratos de lúpulo foi determinada *in vitro* a partir dos radicais ABTS (2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) e DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), conforme descrito anteriormente por Re et al. (1999) e Brand-Williams, Cuvelier & Berset (1995), respectivamente.

Previamente, uma solução aquosa 7 mM de ABTS⁺ foi adicionada a uma solução de persulfato de potássio a 2,45 mM. A mistura foi mantida no escuro à temperatura ambiente

durante 16 horas. A solução de trabalho contendo o cátion radical ABTS⁺ foi obtida através da diluição da mistura anterior até que fosse atingida absorvância de 0,700, em 734 nm. Para a análise, 3,5 mL da solução de radical ABTS⁺ preparada foi adicionada a 0,5 mL do extrato diluído com etanol (1:50 v/v). Após a mistura reagir por 6 minutos, mediu-se a absorvância a 734 nm. Uma curva de calibração utilizando Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8- tetrametilcroman-2-carboxílico) foi estabelecida (0 - 110 µM). A atividade antioxidante de cada amostra testada foi expressa em equivalentes de Trolox (µmol Trolox.g⁻¹).

Para o ensaio com DPPH, uma solução do radical a 1 mM foi preparada, cuja absorvância foi ajustada para 0,700, em 515 nm. Uma alíquota de 0,5 mL de cada extrato diluído com etanol (1:5 v/v) foi adicionada de 3,5 mL da solução do radical DPPH. Após 30 minutos em repouso, no escuro, foi lida a absorvância da solução a 515 nm. Os atividade antioxidante de cada amostra testada foi expressa em equivalentes de Trolox (µmol Trolox.g⁻¹).

2.6. Determinação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi analisada frente cinco bactérias patogênicas de origem alimentar: *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Typhimurium*, e *Staphylococcus aureus*. Foi verificada também a atividade antifúngica frente o fungo deteriorador *Byssochlamys nivea*.

2.6.1. Microrganismos, meios de cultura e condições de crescimento

Cepas de *E. coli* (ATCC 11229), *L. monocytogenes* (ATCC 7644), *P. aeruginosa* (ATCC 15442), *S. Typhimurium* (ATCC 14028) e *S. aureus* (ATCC 6538) foram utilizadas para determinar a atividade antibacteriana dos extratos de lúpulo. As culturas utilizadas estavam preservadas a -80 °C no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, da Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, Brasil. Para os testes, as bactérias foram ativadas duas vezes em

caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) (Himedia,, Mumbai, Índia) e cultivadas em ágar PCA (Himedia, Mumbai, Índia) por 24h a 35 °C. O inóculo de *B. nivea* (isolado de suco de frutas) foi obtido a partir de uma suspensão de esporos, da qual uma pequena amostra foi utilizada para ativação das células em caldo nutriente (Himedia, Mumbai, India) (35 °C, 24h). Além dos mencionados, os meios de cultura utilizados para os ensaios antimicrobianos foram: ágar Müller-Hinton (Sigma-Aldrich, Índia), ágar BHI (Himedia, Mumbai, Índia) e BDA (Batata Dextrose Ágar) (Sigma-Aldrich, Espanha).

2.6.2. Teste da susceptibilidade bacteriana

A susceptibilidade bacteriana aos extratos foi determinada através do método de difusão em ágar por cavidade em placa conforme metodologia descrita por Deans & Ritchie (1987), com modificações. Placas contendo ágar Müller-Hinton foram inoculadas, com auxílio de *swab*, com as suspensões bacterianas, de turbidez equivalente ao padrão McFarland 0,5. Orifícios de aproximadamente 6 mm de diâmetro foram feitos no ágar inoculado. Uma alíquota de 5 µL de cada extrato foi adicionada aos orifícios. Os antibióticos tetraciclina e ampicilina foram utilizados como controles positivos e etanol 96% (v/v) foi utilizado como controle negativo. As placas foram incubadas a 35 °C por 24h e as zonas de inibição, indicando a atividade dos extratos, medidas em milímetros.

2.6.3. Concentração Mínima Inibitória e Concentração Mínima Bactericida

As Concentrações Mínimas Inibitórias (CMI) dos extratos foram determinadas através do método de microdiluição em caldo, em microplacas de 96 poços, conforme metodologia descrita por Bassanetti et al. (2017). Alíquotas de 100 µL de caldo BHI foram adicionadas aos poços das microplacas. Então, 100 µL de cada extrato foram transferidos aos poços da primeira e diluídos seriadamente. Para a preparação do inóculo, colônias selecionadas de cada bactéria

patogênica foram suspensas em solução salina 0,85% (m/v) afim de se obter suspensões com turbidez equivalente ao padrão MacFarland 0,5. As suspensões foram duplamente diluídas resultando em um inóculo de aproximadamente 10^6 UFC.mL⁻¹. Aliquotas de 100 µL dos inóculos obtidos foram adicionadas aos poços. As microplacas foram incubadas a 35 °C por 24 h. CMI foi definida como a menor concentração de cada extrato capaz de prevenir o crescimento bacteriano visível nos poços.

Para a determinação da Concentração Mínima Bactericida (CMB), alíquotas de 100 µL de cada poço sem crescimento visível (CMI), e do poço acima, foram plaqueadas em ágar BHI e incubadas a 35 °C por 24 h. CMB foi definida como a menor concentração de cada extrato sem crescimento de colônias de bactérias (Bassanetti et al., 2017).

2.6.4. Atividade antifúngica

A avaliação da atividade antifúngica dos extratos frente *B. nivea* foi determinada através de metodologia descrita por Pires & Piccoli (2012), com modificações. Placas de Petri foram vertidas com 10 mL de BDA. Após solidificação, 10 mL de BDA contendo os extratos em diferentes concentrações (0, 0,4, 1, 5, 10 e 20 µL.mL⁻¹) foram vertidos sobre a primeira camada de ágar. Uma alça de platina foi utilizada para transferir uma pequena amostra do inóculo de *B. nivea* para o centro da placa de Petri. As placas foram incubadas a 25 °C por sete dias e o diâmetro micelial medido em milímetros.

2.7. Determinação de α e β -ácidos

A determinação de α e β -ácidos nas amostras de extratos hidroetanólicos de lúpulos consistiu em análise cromatográfica utilizando uPLC equipado com sistema de bombas quaternárias e detector DAD (Waters ACQUITY H-Class PLUS, Waters Corporation, EUA). Para o ensaio, os extratos foram previamente filtrados em membrana de 0,22 µm. Uma coluna de fase reversa

C18 (50 mm x 2,1 mm, 1,7 μm) (Waters Corporation, Irlanda) foi utilizada. A separação ocorreu a 30 °C, com fluxo de 0,2 mL.min⁻¹. O gradiente de eluição consistiu na fase móvel A (ácido acético:água, 25:975, v/v) e fase móvel B (acetonitrila) e os seguintes gradientes: 0 a 20 min, 100% a 0% A em B; 20 a 27 min, 100% B. O volume de injeção foi de 3 μL . O comprimento de onda utilizado para detecção foi 320 nm. Uma mistura de α -ácidos e β -ácidos (Versuchsstation Schweizerische Brauereien, Zurique, Suíça) de composição conhecida ICE-3 (Extrato de Calibração Internacional: 13,88% cohumulona, 30,76% N+adhumulona, 13,44% colupulona, 10,84% N+adlupulona) foi utilizada como padrão externo para quantificação dos compostos. Os teores dos α e β -ácidos em estudo foram calculados a partir de curva de calibração dos padrões (0,075 – 9,6 mg.mL⁻¹): 3.145.396,77x – 456462 para cohumulona, com R²=0,9973; 6.670.991,14x – 234732 para humulona+adhumulona, com R²=0,9994; 2.509.653,55x – 45885 para colupulona, com R²=1; 2.350.128,32x – 130179 para lupulona+adlupulona, com R²=0,9936.

2.8. Análise Estatística

O experimento foi conduzido sob delineamento inteiramente casualizado. Os ensaios foram realizados em triplicata, exceto pelos testes antimicrobianos, em duplicata, com três repetições. Os resultados das análises foram submetidos a análise de variância (p<0,05) e testes de comparação múltipla, quando pertinente. Para atividade antifúngica, foi realizada análise de regressão (p<0,05) (*SigmaPlot* 11.0, *Systat*®). Os dados experimentais foram analisados através do software *Statistica*, versão 12.0 (*StatSoft*®).

3. Resultados e Discussão

3.1. Perfil fenólico e atividade antioxidante

O lúpulo é um insumo essencial para a produção de cervejas, sendo também reconhecido por importantes propriedades biológicas. A atividade antioxidante de diferentes cultivares de lúpulo tem despertado o interesse neste insumo, indicando sua potencial aplicação como conservante natural (Patent No. US 7.550,162 B2, 2009; Machado, Faria, Melo, Martins, & Ferreira, 2019). O incentivo ao cultivo do lúpulo no Brasil vem aumentando nos últimos cinco anos e estudos sobre a composição química e atividades biológicas desses lúpulos produzidos em um país de clima tropical são escassos.

Entre os extratos hidroetanólicos dos lúpulos investigados, o originado da variedade “Canastra” apresentou o maior teor de compostos fenólicos totais (35,10 mg GAE.g⁻¹), enquanto as variedades Spalt e Saaz evidenciaram o menor conteúdo dos compostos mencionados (15,22 e 14,31 mg GAE.g⁻¹, respectivamente). Em contrapartida, as variedades Premiant (13,08 mg CE.g⁻¹) e Columbus (12,82 mg CE.g⁻¹) exibiram os maiores teores de flavonoides totais (Tabela 1).

Tabela 1. Conteúdo de fenóis totais, flavonoides totais e atividade antioxidante das cultivares de lúpulo (média ± desvio padrão, n=3)

Variedade	Fenóis Totais* (mg GAE.g ⁻¹)	Flavonoides Totais** (mg CE.g ⁻¹)	Atividade antioxidante (µmol Trolox.g ⁻¹)	
			ABTS***	DPPH****
Spalt	15,22 ± 0,70 f	6,70 ± 0,72 e	58,21 ± 18,17 d	27,52 ± 7,99 ab
Saaz	14,31 ± 0,69 f	5,72 ± 0,49 e	56,91 ± 21,96 d	25,57 ± 4,19 b
Vitória	29,34 ± 0,23 c	10,56 ± 0,90 bc	132,45 ± 15,19 abc	24,11 ± 2,03 b
Cascade	21,78 ± 0,39 e	7,52 ± 0,54 e	79,24 ± 13,21 cd	29,24 ± 5,80 ab
^a Mantiqueira	20,18 ± 0,60 e	10,46 ± 0,09 bc	78,53 ± 10,89 cd	26,86 ± 2,80 b
Columbus	31,09 ± 0,26 bc	12,82 ± 1,30 ab	139,84 ± 25,44 ab	29,95 ± 4,29 ab
^b Brasylijsk	20,46 ± 0,38 e	7,98 ± 0,60 de	65,98 ± 11,85 d	25,75 ± 4,48 b
^c “Canastra”	35,10 ± 0,19 a	10,13 ± 0,12 cd	165,13 ± 2,97 a	35,15 ± 4,87 ab
Halertau	31,38 ± 1,21 b	10,56 ± 0,66 bc	90,16 ± 22,67 bcd	43,66 ± 11,62 a
Mittelfrüh				
Premiant	24,96 ± 0,69 d	13,08 ± 1,45 a	84,10 ± 34,60 bcd	25,48 ± 1,17 b

Pares de médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey (p≤0,05). *Coeficiente de variação (%) = 2,60; **Coeficiente de variação (%) = 2,74; ***Coeficiente de variação (%) = 21,70; ****Coeficiente de variação (%) = 19,46.

^aLúpulo obtido por Rodrigo Veraldi (Serra da Mantiqueira, Brasil) que obteve sucesso após tentativas de cultivar essa planta na região de mesmo nome. Variedade inédita, obtida a partir de sementes que germinaram no solo e condições climáticas do Brasil.

^bVariedade de lúpulo que chegou no país na época da colonização de poloneses no Estado do Paraná (1860 ou 1870), cultivado até hoje em pequenas propriedades no Sul desse Estado, o nome desse material foi dado pelo produtor Jones Boyaski, sendo o significado ‘brasileiro’ em polaco.

^cVariedade de lúpulo com vigor diferente dos outros cultivares, porém não tem a identificação de sua origem genética, o material foi enviado com esse nome pelo produtor Paulo R. C. Cordeiro (*in memoriam*) produzidos em Nova Friburgo – RJ (safra 2017-2018).

É sabido que fatores como a cultivar, o ambiente e parâmetros de plantio afetam o conteúdo de metabólitos secundários das plantas, influenciando o acúmulo de diferentes compostos,

como fenóis e flavonoides no lúpulo (Čeh, Kač, Košir, & Abram, 2007). Neste trabalho, a cultivar demonstrou ser um fator significativo na variação do teor dos compostos mencionados nos cones de lúpulo.

Um estudo conduzido por Kowalczyk, Micha, Cichočka, & Gawlik-dziki (2013) avaliou, além da cultivar, o método de extração. No referido trabalho, os extratos hidroetanólicos (50% etanol v/v) dos cones de lúpulo referentes às variedades Magnum (Alemanha) e Marynka (Polônia) apresentaram maiores teores de compostos fenólicos (44,22 e 54,78 mg GAE.g⁻¹, respectivamente) quando comparadas às cultivares brasileiras. Entretanto, as cultivares de lúpulo produzidas no Brasil demonstraram ser melhor fonte de flavonoides quando comparadas às variedades europeias do estudo mencionado.

Em contrapartida, para o extrato metanólico (metanol 80%, v/v) obtido por Kähkönen et al. (1999), com auxílio de ultrassom, o teor de fenólicos totais do lúpulo (23,1 mg GAE.g⁻¹) foi inferior ao encontrado para algumas cultivares analisadas no presente trabalho. Tal fato torna ainda mais evidente a influência da cultivar, local de plantio e técnicas de extração empregadas, além de demonstrar que as cultivares brasileiras constituem uma boa fonte de compostos fenólicos.

As análises utilizando os radicais ABTS e DPPH evidenciam a capacidade de um antioxidante em prevenir a ação de espécies reativas de radicais livres sobre os componentes de sistemas biológicos (Silva et al., 2018). De acordo com os resultados de DPPH, a atividade antioxidante dos extratos em estudo assumiu valores entre 24,11 e 43,66 µmol Trolox.g⁻¹, tendo a cultivar Halertau Mittelfrüh, apresentado um potencial antioxidante superior ao verificado para a variedade tcheca comercial utilizada como parâmetro de comparação (Premiant). Dos dados obtidos para o ensaio com o radical ABTS, destaque para os extratos referentes às cultivares Vitória (132,45 µmol Trolox.g⁻¹), Columbus (139,84 µmol Trolox.g⁻¹) e “Canastra” (165,13 µmol Trolox.g⁻¹) exibindo os maiores potenciais antioxidante dentre as cultivares de

lúpulo, com esta última mencionada superando, inclusive, a variedade comercial Premiant. As diferenças associadas aos resultados obtidos para ambos os ensaios estão relacionadas às distintas afinidades dos radicais às moléculas.

Uma elevada gama de substâncias que integram a composição química do lúpulo são responsáveis pelas características antioxidantes da planta, associadas principalmente à presença e posição de grupos hidroxila conjugados a anéis aromáticos (Karabin et al., 2014). Em sua grande maioria, constituem-se metabólitos secundários cuja presença e quantidade são inerentes a condições adversas às quais a planta é exposta, a exemplo dos polifenóis.

Os compostos fenólicos (flavonoides e ácidos fenólicos) são alguns dos maiores responsáveis pela atividade antioxidante do lúpulo, sendo as variedades com maior teor de fenóis associadas a um maior potencial antioxidante (Kowalczyk et al., 2013; Sanz et al., 2019). Desmetilxanthohumol e xanthohumol, prenilflavonoides exclusivos do lúpulo, também estão relacionados às propriedades antioxidantes da planta (Bocquet et al., 2019). Logo, as diferenças na proporção desses compostos encontrados em cada cultivar de lúpulo resultam em potenciais antioxidantes singulares.

3.2. Testes antimicrobianos *in vitro*

3.2.1. Susceptibilidade bacteriana

A susceptibilidade bacteriana ao lúpulo foi verificada através do método de difusão em ágar por cavidade em placa. Os extratos exibiram atividades distintas frente às bactérias testadas, sendo *S. aureus* o microrganismo de maior sensibilidade à atividade antimicrobiana dos extratos testados (Tabela 2).

Tabela 2. Médias de diâmetros das zonas de inibição, em mm, dos extratos obtidos para as diferentes variedades de lúpulo frente cinco bactérias patogênicas (média \pm desvio padrão, n=3)

Variedade	Bactéria				
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>L. monocytogenes</i>
Spalt	18,2 \pm 2,9 eA	10,8 \pm 5,0 bA	10,5 \pm 2,8 bA	11,5 \pm 1,4 bA	15,2 \pm 3,2 abA
Saaz	20,8 \pm 1,7 cdeA	11,3 \pm 1,9 bA	14,2 \pm 3,2 abA	0,0 \pm 0,0 cB	0,0 \pm 0,0 bB
Vitória	29,7 \pm 5,5 cA	14,7 \pm 5,3 bB	10,0 \pm 9,2 bB	0,0 \pm 0,0 cC	18,2 \pm 2,5 abC
Cascade	20,2 \pm 3,2 deA	0,0 \pm 0,0 cB	0,0 \pm 0,0 cB	0,0 \pm 0,0 cB	12,0 \pm 0,0 bA
Mantiqueira	23,7 \pm 10,7 cdeA	0,0 \pm 0,0 cC	0,0 \pm 0,0 cC	0,0 \pm 0,0 cC	10,0 \pm 3,5 bB
Columbus	35,5 \pm 17,3 abcA	8,7 \pm 1,1 bcB	0,0 \pm 0,0 cB	9,7 \pm 1,1 bB	0,0 \pm 0,0 cB
Brasyljisk	27,7 \pm 5,3 bcdA	0,0 \pm 0,0 cC	0,0 \pm 0,0 cC	10,0 \pm 2,1 bB	0,0 \pm 0,0 cC
“Canastra”	26,5 \pm 0,9 cdA	0,0 \pm 0,0 cB	0,0 \pm 0,0 cB	9,5 \pm 0,9 bcB	0,0 \pm 0,0 cB
Halertau					
Mittelfrüh	14,7 \pm 1,9 eA	0,0 \pm 0,0 cB	0,0 \pm 0,0 cB	12,5 \pm 2,1 bA	0,0 \pm 0,0 cB
Premiant	19,8 \pm 0,8 eA	0,0 \pm 0,0 cC	14,0 \pm 2,1 abA	12,0 \pm 6,4 bB	0,0 \pm 0,0 cC
Tetraciclina	38,8 \pm 1,7 aA	27,3 \pm 4,5 aB	20,5 \pm 0,5 aB	31,2 \pm 7,8 aAB	23,2 \pm 7,3 aB
Ampicilina	40,8 \pm 0,8 aA	18,2 \pm 0,8 abB	19,0 \pm 9,9 abB	20,7 \pm 0,3 bB	17,8 \pm 6,0 abB

Resultados expressos por média \pm desvio padrão. Pares de médias seguidos de pelo menos uma mesma letra maiúscula, na horizontal, ou de pelo menos uma mesma letra minúscula, na vertical, não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p>0,05$). Coeficiente de Variação (%) = 32,77.

O extrato hidroetanólico da cultivar Columbus apresentou atividade similar à dos antibióticos controle frente *S. aureus*, com halo de inibição de 35,5 mm em comparação aos evidenciados para Tetraciclina (38,8 mm) e Ampicilina (40,8 mm). Além disso, dentre as cultivares em análise, apenas a brasileira Spalt exibiu atividade frente a todas as bactérias testadas, com halos de inibição similares para os cinco microrganismos. Em uma perspectiva geral, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *L. monocytogenes* mostraram-se menos susceptíveis à atividade

dos extratos de lúpulo, evidenciando zonas de inibição frente a apenas quatro das dez cultivares testadas.

Weber et al. (2019) ao analisarem o potencial de extratos de lúpulo incorporados à géis de uso tópico frente *Propionibacterium acnes* e *Staphylococcus aureus*, verificaram zonas de inibição de 5,5 mm e 3,0 mm para os dois microrganismos, respectivamente. Um estudo similar, visando avaliar a atividade antibacteriana isolada de alguns componentes do lúpulo, Bhattacharya, Virani, Zavro, & Haas (2003) observaram respectivas zonas de inibição de 13 mm e 10 mm para beta ácidos e xanthohumol, testados frente *Streptococcus mutans*.

A rica composição dos cones de lúpulo é responsável por sua atividade antimicrobiana. Lupulonas, humulonas e xanthohumol são identificados como os principais compostos associados a tal atividade (Alonso-Esteban et al., 2019). Além disso, demais substâncias como catequinas e outros compostos fenólicos do lúpulo são descritos como potenciais antimicrobianos (Gomes et al., 2018).

A natureza hidrofóbica dos agentes antimicrobianos do lúpulo facilita sua penetração através da parede celular bacteriana e interação com a membrana interna, resultando em danos à sua estrutura (Rozalski et al., 2013). Neste contexto, ocorre a inibição do transporte ativo de açúcares e aminoácidos (Teuber & Schmalreck, 1973). Todavia, uma maior efetividade dos cones de lúpulo é verificada frente bactérias Gram-positivas (Kramer et al., 2015).

A superfície celular de bactérias Gram-positivas é mais hidrofóbica quando comparada à de bactérias Gram-negativas (Lim & Mustapha, 2007), o que justifica sua maior susceptibilidade diante das moléculas apolares do lúpulo que exibem atividade antibacteriana. Além disso, os lipopolissacarídeos (LPS) componentes da membrana externa de bactérias Gram-negativas atuam como barreira a diversas moléculas hidrofóbicas (Delcour, 2010; Donnenberg, 2015). A fração de oligossacarídeos dos LPS pode ser estender até 30 Å além da superfície da membrana

externa, inibindo a difusão de substâncias tais como α -ácidos, β -ácidos e polifenóis (Fattouch et al., 2007; Teuber & Schmalreck, 1973; Wiener & Horanyi, 2011).

Menciona-se ainda que, alguns ácidos inerentes ao lúpulo, como os iso- α -ácidos, por possuírem características ionóforas, podem dissipar o gradiente de prótons transmembranar e reduzir o pH interno das células dos microrganismos (Schurr, Hahne, Kuster, Behr, & Vogel, 2015).

O mesmo ensaio utilizado no presente trabalho para verificar a susceptibilidade bacteriana aos extratos de lúpulo foi proposto por Dušek, Jandovská, Čermák, Mikyška, & Olšovská (2016) frente *Staphylococcus aureus*, de modo a identificar os compostos bioativos do lúpulo responsáveis pela formação das zonas de inibição. Um grupo de cerca de 56 compostos foi identificado pelos autores, dentre os quais menciona-se cohumulona, humulona, colupulona, lupulona, xanthohumol e isaoxanthohumol,

3.2.2. Concentração Mínima Inibitória e Concentração Mínima Bactericida

Os extratos de lúpulo apresentaram atividade inibitória frente todas as cinco bactérias em estudo (Tabela 3). As médias de CMI variaram de concentrações abaixo de $0,093 \text{ mg.mL}^{-1}$ a $7,21 \text{ mg.mL}^{-1}$, enquanto as CMB ficaram entre $0,12 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $8,65 \text{ mg.mL}^{-1}$.

Tabela 3. Concentração Mínima Inibitória (MIC) e Concentração Mínima Bactericida (MBC), em mg.mL⁻¹, dos extratos referentes às variedades de lúpulo frente a cinco patógenos alimentares

Bactéria	Spalt		Saaz		Vitória		Cascade		Mantiqueira		Columbus		Brasilijsk		“Canastra”		Halertau Mittelfrüh		Premiant	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Staphylococcus aureus</i>	<0,097	0,16	0,36	0,69	<0,13	0,13	<0,096	0,16	0,33	1,30	<0,11	0,15	<0,11	0,15	<0,093	0,12	0,08	0,096	0,18	0,36
<i>Escherichia coli</i>	0,81	2,58	0,87	2,89	0,89	2,85	0,77	2,56	1,12	3,35	0,91	3,02	0,89	2,96	0,74	2,48	0,46	1,53	5,77	7,21
<i>Salmonella</i> Typhimurium	1,29	5,17	0,87	3,46	1,07	2,85	0,77	3,08	1,86	7,46	1,21	3,63	1,18	3,56	0,99	2,98	0,61	1,83	7,21	8,65
<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	0,81	2,59	0,87	2,31	0,89	2,85	0,64	2,05	1,19	4,47	0,91	3,02	0,89	2,96	0,62	2,98	0,38	1,53	1,98	6,49
<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	0,81	2,59	0,87	3,46	1,07	3,56	0,77	3,08	1,19	4,65	0,91	3,63	0,89	3,70	0,74	2,98	0,46	1,83	3,24	7,21

Novamente, destacou-se o efeito antimicrobiano contra *S. aureus*, dentre demais microrganismos, requerendo as menores concentrações dos extratos para inibição de seu crescimento.

A bactéria Gram-positiva mencionada não apresentou crescimento visual nas menores concentrações testadas dos extratos referentes às variedades Spalt (CMI < 0,097 mg.mL⁻¹), Vitória (CMI < 0,13 mg.mL⁻¹), Cascade (CMI < 0,096 mg.mL⁻¹), Columbus (CMI < 0,11 mg.mL⁻¹), Brasilisjk (CMI < 0,11 mg.mL⁻¹) e “Canastra” (CMI < 0,093 mg.mL⁻¹), requerendo concentrações levemente superiores para que houvesse o efeito bactericida (CMB). Em contrapartida, entre as bactérias testadas, a Gram-negativa *Salmonella* Typhimurium evidenciou as maiores CMI e CMB para os extratos em análise. Além disso, as cultivares brasileiras, em sua maioria, demonstraram possuir maior potencial antimicrobiano que a cultivar comercial diante das espécies de bactérias em estudo, com a menor concentração mínima inibitória evidenciada para a variedade “Canastra”.

Abram et al. (2015) analisaram extratos hidroetanólicos (etanol 96%, v/v) de cones de lúpulo de variedades provenientes de diferentes países (Eslovênia, Áustria, Alemanha e República Tcheca). Tal estudo mostrou a atividade antimicrobiana das cultivares analisadas, cujas CMI variaram entre 0,0013 mg.mL⁻¹ e 0,0029 mg.mL⁻¹ frente *S. aureus*, inferiores às verificadas para a bactéria Gram-negativa *E. coli* O157:H7 (0,19 < CMI < 0,43 mg.mL⁻¹).

No estudo conduzido por Bocquet et al. (2019), extratos hidroetanólicos (etanol 90%, v/v), produzidos a partir de inflorescências femininas de lúpulo da cultivar Nugget (França), exibiram diferentes atividades antimicrobianas frente uma série de bactérias Gram-positivas, a exemplo de *S. aureus* e *Enterococcus* sp., que apresentaram CMI de 0,039 mg.mL⁻¹ e 0,156 mg.mL⁻¹, respectivamente. Entretanto, não foi identificada atividade frente nenhuma das bactérias Gram-negativas analisadas, tais como *E. coli*, *P. aeruginosa* e *Salmonella* sp.

É importante mencionar o papel anti-estafilocócico dos compostos fenólicos, sendo reconhecida a atividade de chalconas preniladas e derivados de acylphlorogucinóis (α -ácidos e β -ácidos) frente estirpes selecionadas de *S. aureus* (Bocquet et al., 2019). Tais resultados foram reportados por estudos que mencionaram o fato de espécies de *Staphylococcus* sp. serem mais susceptíveis a polifenóis (Silva et al., 2018; Szewczyk, Zidorn, Biernasiuk, Komsta, & Granica, 2016; Yam, Shah, & Hamilton-Miller, 2006).

No presente estudo, *L. monocytogenes*, Gram-positiva, apresentou CMI similares ou superiores às verificadas para as bactérias Gram-negativas em análise. Shimwell (1937) relatou em seu estudo que há diferenças na susceptibilidade aos componentes do lúpulo entre espécies de bactérias Gram-positivas, o que pode justificar as distintas atividades dos extratos frente *L. monocytogenes* e *S. aureus*.

Listeria monocytogenes e *Staphylococcus aureus* estavam entre as bactérias analisadas por Kramer et al. (2015) para avaliar a atividade antibacteriana dos componentes do lúpulo. Os autores também verificaram maior atividade dos componentes do lúpulo frente *S. aureus*. Algumas diferenças podem ser observadas entre as superfícies das duas bactérias que poderiam influenciar na maior susceptibilidade estafilocócica, a exemplo da maior quantidade de proteínas ligadas à parede celular de *L. monocytogenes*, tornando-a mais hidrofílica (Cabanes, Dehoux, Dussurget, Frangeul, & Cossart, 2002). Além disso, a estrutura de peptidoglicanos inerente à parede celular de *L. monocytogenes* se assemelha à descrita para muitas bactérias gram-negativas, tais como *E. coli* (Bierne & Cossart, 2007).

Lupulonas e humulonas presentes nos cones de lúpulo também estão associadas a atividade antimicrobiana da planta. Lupulonas são conhecidas por melhor atividade bactericida, por ser menos solúvel em água e possuir maior hidrofobicidade. Tal fato é justificado devido ao número e comprimento das cadeias laterais de suas moléculas, que aumentam seu caráter lipofílico e

auxiliam o contato com a membrana celular bacteriana (Bocquet et al., 2018; Larson et al., 1996; Teuber & Schmalreck, 1973).

Xanthohumol constitui outro composto de grande importância para o potencial antimicrobiano do lúpulo. Atuando como inibidor da diacilglicerol aciltransferase, é um potente inibidor do metabolismo de lipídios. Tal atividade poderia afetar significativamente a composição e estabilidade da membrana e parede celular microbiana (Rozalski et al., 2013; Sakai et al., 2012).

Como já mencionado, o rompimento da membrana celular é dito como o primeiro evento associado à atividade antimicrobiana dos compostos inerentes ao lúpulo. Os eventos que se sucedem envolvem a inibição da cadeia respiratória e da síntese de proteínas, DNA e RNA (Teuber & Schmalreck, 1973).

3.2.3. Atividade frente *B. nivea*

Um ensaio antifúngico foi realizado com o fungo *Byssosclamyces nivea*, afim de se avaliar o efeito de cinco diferentes concentrações dos extratos de lúpulo. Não houve interação significativa ($p > 0,05$) entre a cultivar do lúpulo e as concentrações analisadas.

Um menor diâmetro micelial do fungo está associado à maior atividade antifúngica do extrato. Tal efeito foi verificado para as cultivares Cascade, “Canastra” e Columbus (Tabela 4), cujo efeito sobre o crescimento fúngico foi significativamente maior ao exibido pela variedade comercial PremiAnt ($p \leq 0,05$).

Tabela 4. Médias do diâmetro micelial, em mm, do fungo *Byssochlamys nivea* para cada extrato obtido das variedades de lúpulo em estudo (média \pm desvio padrão, n=3)

Variedade	Micélio (mm)
Brasylijsk	41,31 \pm 19,36 a
Premiant	40,75 \pm 22,52 a
Saaz	38,76 \pm 20,47 ab
Halertau Mittelfrüh	38,74 \pm 20,39 ab
Mantiqueira	37,61 \pm 19,82 abc
Spalt	37,26 \pm 19,22 abc
Vitória	37,04 \pm 19,48 abc
Cascade	35,43 \pm 20,37 bc
“Canastra”	35,14 \pm 18,92 bc
Columbus	34,04 \pm 20,46 c

Pares de médias seguidos de pelo menos uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade. Coeficiente de Variação (%) = 16,24.

Paralelamente, observou-se o decaimento do diâmetro micelial do fungo *B. nivea* conforme o aumento da concentração dos extratos de lúpulo analisados (Figura 1). A concentração de 20 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ (2% v/v) foi capaz de reduzir consideravelmente o crescimento fúngico, inibindo quase completamente o fungo *B. nivea*. Engelson, Solberg, & Karmas (1980) verificaram em seu estudo que concentrações entre 1,5-2,5 % (v/v) são capazes de inibir o crescimento da forma vegetativa de fungos como *Aspergillus niger* e *Aspergillus glaucus*.

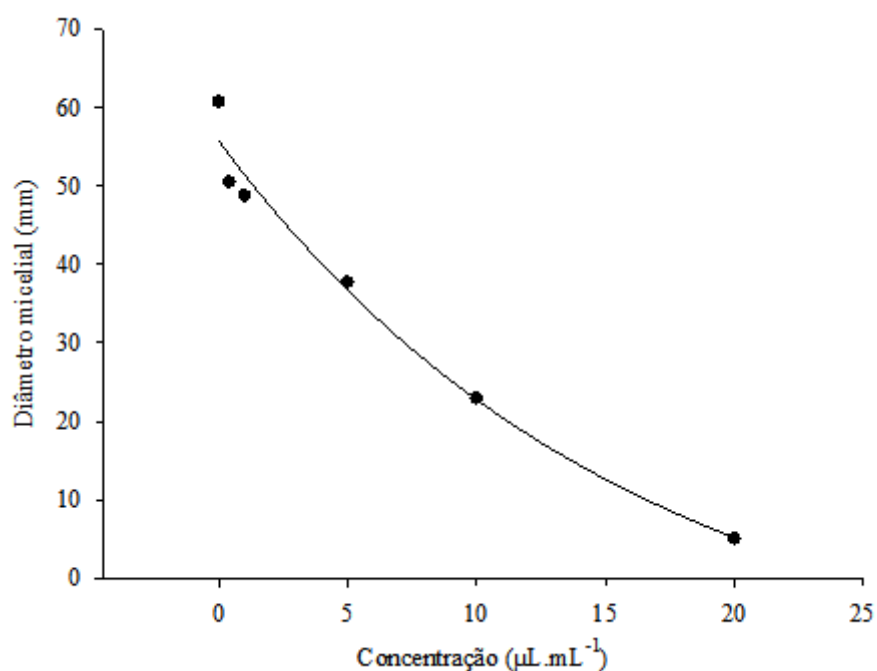


Figura 1. Efeito da concentração dos extratos de lúpulo no crescimento de *Byssochlamys nivea*; $y = -14,8841 + 70,5833e^{-0,0629x}$, $R^2 = 0,9782$; y: diâmetro micelial (mm); x: concentração dos extratos ($\mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$); R^2 : coeficiente de determinação.

O efeito antifúngico dos extratos de cone de lúpulo frente diferentes espécies de fungos, como *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus niger*, foi demonstrado por Nionelli et al. (2018). O referido estudo evidenciou a possível utilização dos extratos de lúpulo como conservantes naturais na fabricação de pães, promovendo o aumento da vida útil dos produtos.

Bocquet et al. (2018) identificaram os compostos provenientes do lúpulo responsáveis por sua atividade antifúngica. O estudo revelou que apenas algumas chalconas e alguns derivados de acilphlorogucinóis afetam o crescimento fúngico, sendo desmetilxanthohumol e cohumulona os principais compostos bioativos. Na maioria dos casos relatados, ao contrário do que ocorre na atividade antibacteriana, na atividade antifúngica os derivados de humulonas são

mais ativos que os derivados de lupulonas (Bocquet et al., 2018; Taylor, Mizobuchi, & Sato, 1985).

O mecanismo de ação antifúngica dos compostos mencionados ainda não foi elucidado. Entretanto, supõe-se que ajam de formas distintas, visto as diferenças em suas estruturas. Associa-se o efeito das cohumulonas a danos na cadeia respiratória das células (Bocquet et al., 2018). Os componentes do lúpulo poderiam ainda exercer atividade na parede celular dos fungos filamentosos, cuja presença de hidrofobinas proporciona uma superfície de interação hidrofóbica (Bocquet et al., 2018; Gow et al., 2017).

3.3. Determinação de α - e β -ácidos

A análise cromatográfica foi realizada com os extratos hidroetanólicos das amostras de lúpulo em estudo. O presente trabalho é um dos pioneiros na quantificação de α e β -ácidos, também conhecidos como resinas moles, em extratos hidroetanólicos de cones de lúpulo por uPLC. Esta técnica gera benefícios econômicos (redução do tempo, energia e quantidade de solventes orgânicos utilizados na análise) além de ser mais sensível e precisa quando comparada a tradicionalmente utilizada HPLC (Jurková, Čejka, & Olsovská, 2012).

A separação dos compostos e sua quantificação foi alcançada através de corrida única. Os compostos de interesse foram identificados, sendo eluídos na seguinte sequência: cohumulona (16,8 min), humulona+adhumulona (17,5 min), colupulona (19,4 min), lupulona+adlupulona (20,0 min). Os ad-compostos estão entre os constituintes minoritários das resinas moles (Hrcic et al., 2019), não sendo requerida para a proposta do presente trabalho a quantificação isolada de humulona/adhumulona e lupulona/adlupulona, logo, os mesmos foram apresentados como misturas. Os cromatogramas obtidos podem ser observados nas Figuras 1-10 do material suplementar (picos identificados como A, B, C e D, conforme ordem de eluição).

Vale enfatizar que o teor de humulonas e lupulonas é fortemente dependente da cultivar do lúpulo (Steenackers et al., 2015) e tal fato foi verificado no presente estudo. Sete, dos dez extratos em análise, apresentaram um conteúdo total das resinas moles entre 9% e 26,03% do peso seco do lúpulo (Tabela 5), em concordância com os valores descritos na literatura que mencionam até cerca de 34% (m.m⁻¹) (Sanz et al., 2019).

Tabela 5. Composição das cultivares de lúpulo quanto ao teor de α -ácidos e β -ácidos (média \pm desvio padrão, n=3)

Variedade	α -ácidos (m.m ⁻¹)			β -ácidos (m.m ⁻¹)		
	Cohumulona*	Humulona + Adhumulona**	α - ácidos	Colupulona***	Lupulona + Adlupulona****	β - ácidos
	Total			Total		
Spalt	2,66 \pm 0,41 e	2,46 \pm 0,78 g	5,12	2,19 \pm 0,51 f	3,67 \pm 0,38 g	5,86
Saaz	4,54 \pm 0,28 d	5,23 \pm 0,34 e	9,77	4,15 \pm 0,24 e	6,03 \pm 0,12 e	10,18
Vitória	12,35 \pm 0,24 b	9,71 \pm 0,19 c	22,06	12,08 \pm 0,27 b	10,19 \pm 0,25 c	23,56
Cascade	3,86 \pm 0,08 d	3,11 \pm 0,04 fg	6,97	3,67 \pm 0,05 e	4,15 \pm 0,08 g	7,82
Mantiqueira	2,46 \pm 0,03 e	2,48 \pm 0,04 g	4,94	1,82 \pm 0,02 f	2,24 \pm 0,02 h	4,06
Columbus	15,48 \pm 0,38 a	17,99 \pm 0,47 a	33,47	10,79 \pm 0,20 c	10,03 \pm 0,18 c	20,82
Brasylijsk	2,50 \pm 0,08 e	3,42 \pm 0,14 fg	5,92	4,99 \pm 0,22 d	10,19 \pm 0,14 c	15,18
“Canastra”	15,69 \pm 0,33 a	14,12 \pm 0,32 b	29,81	15,11 \pm 0,10 a	15,26 \pm 0,15 a	30,37
Halertau	7,21 \pm 0,19 c	6,76 \pm 0,18 d	13,97	4,89 \pm 0,32 d	7,17 \pm 0,30 d	12,06
Mittelfrüh						
Premiant	3,11 \pm 0,18 e	4,01 \pm 0,29 f	7,12	1,76 \pm 0,35 f	4,94 \pm 0,15 f	6,70

Apresentação de médias \pm desvio padrão. Pares de médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). *Coeficiente de variação (%) = 3,65; **Coeficiente de variação (%) = 5,06; ***Coeficiente de variação (%) = 3,33; ****Coeficiente de variação (%) = 3,57.

As exceções que excederam tal intervalo foram as cultivares Vitória, Columbus e “Canastra”, apresentando teores excepcionalmente superiores aos já relatados para α e β -ácidos, acumulando um conteúdo total de 45,62% (m.m⁻¹), 50,29% (m.m⁻¹) e 60,18% (m.m⁻¹), respectivamente. Teores tão elevados de resinas moles em cultivares de lúpulo ainda não haviam sido reportadas na literatura. Como observado na Tabela 5, todos os α e β -ácidos analisados no presente trabalho exibiram teores elevados para as três cultivares mencionadas.

Os extratos de cones lúpulo apresentaram perfis cromatográficos distintos, evidenciando diferenças na composição química de acordo com a cultivar (Figuras 1-10, Material Suplementar). Os picos referentes às humulonas e lupulonas das variedades Vitória, Columbus e “Canastra” exibiram área nitidamente superior às apresentadas para as demais cultivares em estudo. Tais cultivares são fontes excepcionais de resinas moles. Novas análises cromatográficas seriam sugestivas para verificação de toda a composição química dessas variedades.

Numa perspectiva geral, a maioria das cultivares apresentaram proporções similares de α -ácidos e β -ácidos. Apenas as cultivares Columbus e Brasylijsk exibiram grandes diferenças no conteúdo dos dois grupos de substâncias. A cultivar Columbus apresentou elevado teor de α -ácidos, enquanto a cultivar Brasylijsk caracterizou-se como uma cultivar com alto teor de β -ácidos.

Entre as dez cultivares de lúpulo analisadas, Columbus apresentou o maior teor de humulonas, totalizando 33,47% (m.m⁻¹). Tal fato pode ser associado à atividade antifúngica apresentada por esta cultivar, cujo extrato foi responsável por um dos maiores efeitos sobre o crescimento micelial de *B. nivea*. Por outro lado, a variedade “Canastra” se destacou com teor de lupulonas representando 30,37% do peso seco total dos cones de lúpulo. Um elevado teor de lupulonas pode ter sido um dos fatores que justificam a menor concentração mínima inibitória verificada no presente estudo para a bactéria Gram-positiva *S. aureus*.

Em estudo realizado por De Keukeleire et al. (2003), utilizando as inflorescências femininas de diferentes variedades de lúpulo, a variedade Admiral (Bélgica) apresentou cerca de 17,95% (m.m^{-1}) de humulonas (cohumulona e humulona+adhumulona) enquanto 6,77% (m.m^{-1}) da variedade Wye Target (Bélgica) consistiu em lupulonas (colupulona e lupulona+adlupulona).

Humulonas são compostos indispensáveis para a qualidade dos lúpulos utilizados em cervejarias, fornecendo o amargor característico da bebida e contribuindo para a estabilidade da espuma. Tais características estão relacionadas à sua isomerização a iso- α -ácidos sob condições de elevada temperatura (100-130 °C) e pH (8-10) (Hrncic et al., 2019; Zanolli & Zavatti, 2008). Por sua vez, as lupulonas estão associadas predominantemente ao efeito antimicrobiano aqui já discutido, mas também são responsáveis pelo aroma da bebida (Sanz et al., 2019).

Além do papel desempenhado na fabricação de cervejas, as resinas moles do lúpulo podem ser empregadas na produção de demais matrizes alimentícias e medicamentos, em função de suas propriedades biológicas. Os potenciais antioxidante e antimicrobiano dos α - e β -ácidos são de grande valia no auxílio à conservação de alimentos (Kramer et al., 2015; Larson et al., 1996; Nionelli et al., 2018).

Como já mencionado, a proporção de resinas moles no lúpulo está intrinsecamente ligada às propriedades bioativas da planta. Cultivares com um conteúdo tão elevado desses compostos, como as cultivares Vitória, Columbus e “Canastra” deste estudo, são de imprescindível interesse não somente para a indústria cervejeira, mas também para diversos segmentos da indústria alimentícia e farmacêutica.

4. Conclusões

As características observadas para os extratos hidroetanólicos de diferentes variedades de lúpulos cultivados no Brasil, em especial o teor elevado de α e β -ácidos, indicam possível

emprego como matéria-prima para as indústrias alimentícia e farmacêutica. As cultivares avaliadas no presente estudo se mostraram potenciais ferramentas na conservação de alimentos, em virtude das atividades antioxidante e antimicrobiana. Além disso, seria de grande interesse a identificação de compostos voláteis e demais constituintes químicos destas variedades ainda pouco exploradas, visando sua aplicação como conservante natural e insumo para a indústria cervejeira.

Conflitos de interesse

Nenhum a declarar

Agradecimentos

Este trabalho teve suporte da Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES). Os autores agradecem o produtor Paulo Cordeiro, pelo fornecimento das cultivares de lúpulo indispensáveis para execução deste trabalho (“*in memorian*”).

Referências

- Abram, V., Čeh, B., Vidmar, M., Hercezi, M., Lazić, N., Bucik, V., ... Poklar Ulrih, N. (2015). A comparison of antioxidant and antimicrobial activity between hop leaves and hop cones. *Industrial Crops and Products*, 64, 124–134. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.11.008>
- Alonso-Esteban, J. I., Pinela, J., Barros, L., Ćirić, A., Soković, M., Calhella, R. C., ... Ferreira, I. C. F. R. (2019). Phenolic composition and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic properties of hop (*Humulus lupulus* L.) Seeds. *Industrial Crops and Products*, 134(April), 154–159. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.04.001>
- Arita, T., Hidaka, K., & Shibuya, K. (2015). *Patent No. US20170367392A1*. United States.
- Bartmańska, A., Wałęcka-Zacharska, E., Tronina, T., Popłoński, J., Sordon, S., Brzezowska, E., ... Huszcza, E. (2018). Antimicrobial properties of spent hops extracts, flavonoids isolated therefrom, and their derivatives. *Molecules*, 23(8), 1–12. <https://doi.org/10.3390/molecules23082059>
- Bassanetti, I., Carcelli, M., Buschini, A., Montalbano, S., Leonardi, G., Pelagatti, P., ... Rogolino, D. (2017). Investigation of antibacterial activity of new classes of essential oils. *Food Control*, 73(Part B), 606–612. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.09.010>
- Berdahl, D. R., Reynhout, G. S., & Schulze, M. H. (2009). *Patent No. US 7.550,162 B2*. United States.
- Bhattacharya, S., Virani, S., Zavro, M., & Haas, G. J. (2003). Inhibition of *Streptococcus mutans* and other oral *Streptococci* by hop (*Humulus lupulus* L.) constituents. *Economic Botany*, 57(1), 118–125. [https://doi.org/10.1663/0013-0001\(2003\)057\[0118:IOSMAO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1663/0013-0001(2003)057[0118:IOSMAO]2.0.CO;2)
- Biendl, M., Engelhard, B., Forster, A., Gahr, A., Lutz, A., Mitter, W., ... Schönberger, C. (2014). *Hops: their cultivation, composition and usage*. Nuremberg, Germany: Fachverlag Hans Carl.
- Bierne, H., & Cossart, P. (2007). *Listeria monocytogenes* surface proteins: from genome predictions to function. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(2), 377–397. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00039-06>
- Bocquet, L., Rivière, C., Dermont, C., Samaillie, J., Hilbert, J. L., Halama, P., ... Sahpaz, S. (2018). Antifungal activity of hop extracts and compounds against the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Industrial Crops and Products*, 122(February), 290–297. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.061>
- Bocquet, L., Sahpaz, S., Bonneau, N., Beaufay, C., Mahieux, S., Samaillie, J., ... Rivière, C. (2019). Phenolic compounds from *Humulus lupulus* as natural antimicrobial products: New weapons in the fight against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, *Leishmania mexicana* and *Trypanosoma brucei* strains. *Molecules*, 24(6), 1024–1050. <https://doi.org/10.3390/molecules24061024>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, 28(1), 25–30. <https://doi.org/10.3906/sag-1411-35>

- Buxiang, S., Lingzhi, T., Jiang, D., Wei, L., & Lihuang, Q. (2009). *Patent No. CN101433592A*. China.
- Caballero, I., Blanco, C. A., & Porras, M. (2012). Iso- α -acids, bitterness and loss of beer quality during storage. *Trends in Food Science and Technology*, 26(1), 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.01.001>
- Cabanes, D., Dehoux, P., Dussurget, O., Frangeul, L., & Cossart, P. (2002). Surface proteins and the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes*. *Trends in Microbiology*, 10(5), 238–245. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(02\)02342-9](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(02)02342-9)
- Callemien, D., & Collin, S. (2010). Structure, organoleptic properties, quantification methods, and stability of phenolic compounds in beer-A review. *Food Reviews International*, 26(1), 1–84. <https://doi.org/10.1080/87559120903157954>
- Čeh, B., Kač, M., Košir, I. J., & Abram, V. (2007). Relationships between xanthohumol and polyphenol content in hop leaves and hop cones with regard to water supply and cultivar. *International Journal of Molecular Sciences*, 8(9), 989–1000. <https://doi.org/10.3390/i8090989>
- Česlová, L., Holčapek, M., Fidler, M., Drštičková, J., & Lísa, M. (2009). Characterization of prenylflavonoids and hop bitter acids in various classes of Czech beers and hop extracts using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216(43), 7249–7257. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.09.022>
- Chen, Q., Fu, M., Chen, M., Liu, J., Liu, X., He, G., & Pu, S. (2012). Preparative isolation and purification of xanthohumol from hops (*Humulus lupulus* L.) by high-speed counter-current chromatography. *Food Chemistry*, 132(1), 619–623. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.10.098>
- David Forest Kuethe, W., & Karman, V. D. (2004). *Patent No. US 2004/0018284 A1*. United States.
- de Clippeleer, J., de Rouck, G., de Cooman, L., & Aerts, G. (2010). Influence of the hopping technology on the storage-induced appearance of staling aldehydes in beer. *Journal of the Institute of Brewing*, 116(4), 381–398. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2010.tb00789.x>
- De Keukeleire, J., Ooms, G., Heyerick, A., Roldan-Ruiz, I., Van Bockstaele, E., & De Keukeleire, D. (2003). Formation and accumulation of α -acids, β -acids, desmethylxanthohumol, and xanthohumol during flowering of hops (*Humulus lupulus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(15), 4436–4441. <https://doi.org/10.1021/jf034263z>
- Deans, S. G., & Ritchie, G. (1987). Antibacterial properties of plant essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 5(2), 165–180. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(87\)90034-1](https://doi.org/10.1016/0168-1605(87)90034-1)
- Delcour, A. H. (2010). Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1794(5), 808–816. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.11.005>. Outer
- Donnenberg, M. S. (2015). Enterobacteriaceae. In *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases* (Vol. 2, pp. 2503–2517). <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-4801-3.00220-4>

- Dušek, M., Jandovská, V., Čermák, P., Mikyška, A., & Olšovská, J. (2016). A novel approach for identification of biologically active phenolic compounds in complex matrices using hybrid quadrupole-orbitrap mass spectrometer: A promising tool for testing antimicrobial activity of hops. *Talanta*, *156–157*, 209–217. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.05.018>
- Engelson, M., Solberg, M., & Karmas, E. (1980). Antimycotic properties of hop extract in reduced water activity media. *Journal of Food Science*, *45*, 1175–1178. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1980.tb06514.x>
- Fattouch, S., Caboni, P., Coroneo, V., Tuberoso, C. I. G., Angioni, A., Dessi, S., ... Cabras, P. (2007). Antimicrobial activity of tunisian quince (*Cydonia oblonga* Miller) pulp and peel polyphenols extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(3), 963–969. <https://doi.org/10.1021/jf062614e>
- Fedorovich, R. J., Anatol'evn, S. N., Olegovna, K. J., & Alekseevna, C. N. (2009). *Patent No. RU2357417C2*. Russia.
- Formato, A., Gallo, M., Ianniello, D., Montesano, D., & Naviglio, D. (2013). Supercritical fluid extraction of α - and β -acids from hops compared to cyclically pressurized solid – liquid extraction. *The Journal of Supercritical Fluids*, *84*, 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2013.09.021>
- Gil-ramírez, A., Antonio, J., Arranz, E., Ruíz-rodríguez, A., Reglero, G., Ibáñez, E., & Marín, F. R. (2012). Highly isoxanthohumol enriched hop extract obtained by pressurized hot water extraction (PHWE). Chemical and functional characterization. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *16*, 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2012.04.006>
- Gomes, F. M. S., da Cunha Xavier, J., dos Santos, J. F. S., de Matos, Y. M. L. S., Tintino, S. R., de Freitas, T. S., & Coutinho, H. D. M. (2018). Evaluation of antibacterial and modifying action of catechin antibiotics in resistant strains. *Microbial Pathogenesis*, *115*(2018), 175–178. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.12.058>
- Gow, N. A. R., Latge, J., Munro, C. A., De Groot, P. W. J., Hellingwerf, K. J., Klis, F. M., ... Gil, C. (2017). The fungal cell wall: structure, biosynthesis, and function. *Microbiology Spectrum*, *5*(3), 3341–3354. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0035-2016.Correspondence>
- Haseleu, G., Intelmann, D., & Hofmann, T. (2009). Structure determination and sensory evaluation of novel bitter compounds formed from β -acids of hop (*Humulus lupulus* L.) upon wort boiling. *Food Chemistry*, *116*(1), 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.008>
- Hrcic, M. K., Spaninger, E., Kosir, I. J., Knez, Z., & Bren, U. (2019). Hop compounds : extraction techniques, chemical analyses, antioxidative, antimicrobial, and anticarcinogenic effects. *Nutrients*, *11*(257), 1–37. <https://doi.org/10.3390/nu11020257>
- Irakli, M., Mygdalia, A., Chatzopoulou, P., & Katsantonis, D. (2019). Impact of the combination of sourdough fermentation and hop extract addition on baking properties, antioxidant capacity and phenolics bioaccessibility of rice bran-enhanced bread. *Food Chemistry*, *285*, 231–239. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.145>
- Jurková, M., Čejka, P., & Olšovská, J. (2012). New trends in liquid chromatography and their

- utilization in analysis of beer and brewery raw materials. Part 3. Comparison of HPLC and UHPLC determination of α - and β -acids. *Kvasny Prumysl*, 58(6), 166–170. <https://doi.org/10.18832/kp2012016>
- Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., & Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10), 3954–3962. <https://doi.org/10.1021/jf9901461>
- Karabin, M., Hudcova, T., Jelinek, L., & Dostalek, P. (2014). Biotransformations and biological activities of hop flavonoids. In *Biotechnology Advances* (Vol. 33). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.02.009>
- Kim, D. O., Jeong, S. W., & Lee, C. Y. (2003). Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry*, 81(3), 321–326. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00423-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00423-5)
- Kováčová, J., Lehotay, J., Úrgeová, E., Mocák, J., & Čížmárik, J. (2011). Determination of selected flavonoids in hop extract by HPLC. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 34(5), 329–340. <https://doi.org/10.1080/10826076.2011.551596>
- Kowalczyk, D., Micha, Ś., Cichočka, J., & Gawlik-dziki, U. (2013). The phenolic content and antioxidant activity of the aqueous and hydroalcoholic extracts of hops and their pellets. *Journal of the Institute of Brewing*, 119(3), 103–110. <https://doi.org/10.1002/jib.73>
- Kramer, B., Thielmann, J., Hickisch, A., Muranyi, P., Wunderlich, J., & Hauser, C. (2015). Antimicrobial activity of hop extracts against foodborne pathogens for meat applications. *Journal of Applied Microbiology*, 118(3), 648–657. <https://doi.org/10.1111/jam.12717>
- Lafontaine, S., Varnum, S., Roland, A., Delpech, S., Dagan, L., Vollmer, D., ... Shellhammer, T. (2018). Impact of harvest maturity on the aroma characteristics and chemistry of Cascade hops used for dry-hopping. *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.148>
- Langezaal, C. R., Chandra, A., & Scheffer, J. J. C. (1992). Antimicrobial screening of essential oils and extracts of some *Humulus lupulus* L. cultivars. *Pharmaceutisch Weekblad Scientific Edition*, 14(6), 353–356. <https://doi.org/10.1007/BF01970171>
- Larson, A. E., Yu, R. R. Y., Lee, O. A., Price, S., Haas, G. J., & Johnson, E. A. (1996). Antimicrobial activity of hop extracts against *Listeria monocytogenes* in media and in food. *International Journal of Food Microbiology*, 33(2–3), 195–207. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)01155-5](https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)01155-5)
- Laws, D. R. J., Bath, N. A., Pickett, J. A., Ennis, C. S., & Wheldon, A. G. (1977). Preparation of hop extracts without using organic solvents. *Journal of the Institute of Brewing*, 83, 39–40.
- Leonida, M. D., Belbekhouche, S., Benzecry, A., Peddineni, M., Suria, A., & Carbonnier, B. (2018). Antibacterial hop extracts encapsulated in nanochitosan matrices. *International Journal of Biological Macromolecules*, 120, 1335–1343. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.003>
- Lermusieau, G., Liégeois, C., & Collin, S. (2001). Reducing power of hop cultivars and beer ageing. *Food Chemistry*, 72(4), 413–418. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00247-8](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00247-8)

- Lim, K., & Mustapha, A. (2007). Inhibition of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* on sliced roast beef by cetylpyridinium chloride and acidified sodium chlorite. *Food Microbiology*, 24, 89–94. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.04.005>
- Liu, Y., Gu, X. H., Tang, J., & Liu, K. (2007). Antioxidant activities of hops (*Humulus lupulus*) and their products. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 65(2), 116–121. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2007-0211-01>
- Machado, J. C., Faria, M. A., Melo, A., Martins, Z. E., & Ferreira, I. M. P. L. V. O. (2019). Modeling of α -acids and xanthohumol extraction in dry-hopped beers. *Food Chemistry*, 278, 216–222. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.050>
- Maietti, A., Brighenti, V., Bonetti, G., Tedeschi, P., Prencipe, F. P., Benvenuti, S., ... Pellati, F. (2017). Metabolite profiling of flavonols and in vitro antioxidant activity of young shoots of wild *Humulus lupulus* L. (hop). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 142, 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.04.043>
- Nionelli, L., Pontonio, E., Gobetti, M., & Rizzello, C. G. (2018). Use of hop extract as antifungal ingredient for bread making and selection of autochthonous resistant starters for sourdough fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 266(May 2017), 173–182. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.12.002>
- Pires, T. C., & Piccoli, R. H. (2012). Inhibitory effect of essential oils from the genus *Citrus* on the microorganisms growth. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, 71(2), 378–385.
- Połeć, K., Barnaś, B., Kowalska, M., Dymek, M., Rachwalik, R., Sikora, E., ... Hąc-Wydro, K. (2019). The influence of the essential oil extracted from hops on monolayers and bilayers imitating plant pathogen bacteria membranes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 173, 672–680. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.10.047>
- Re, R., Pellegrini, N., Protehente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9/10), 1231–1237.
- Rozalski, M., Micota, B., Sadowska, B., Stochmal, A., Jedrejek, D., Wieckowska-Szakiel, M., & Rozalska, B. (2013). Antiadherent and antibiofilm activity of *Humulus lupulus* L. derived products: New pharmacological properties. *BioMed Research International*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/101089>
- Sakai, K., Koyama, N., Fukuda, T., Mori, Y., Onaka, H., & Tomoda, H. (2012). Search method for inhibitors of staphyloxanthin production by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 35(1), 48–53. <https://doi.org/10.1248/bpb.35.48>
- Sanz, V., Torres, M. D., Vilariño, J. M. L., & Domínguez, H. (2019). What is new on the hop extraction? *Trends in Food Science & Technology*, 93, 12–22. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.08.018>
- Schurr, B. C., Hahne, H., Kuster, B., Behr, J., & Vogel, R. F. (2015). Molecular mechanisms behind the antimicrobial activity of hop iso- α -acids in *Lactobacillus brevis*. *Food Microbiology*, 46, 553–563. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.09.017>
- Seman, D. L., Hirschey, J. A., L., A., & Barney, M. (2004). *Patent No. US 2004/0175480 A1*. United States.

- Shimwell, B. J. L. (1937). On the relation between the staining properties of bacteria and their reaction towards hop antiseptic. *Journal of the Institute of Brewing*, 43, 191–195. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1937.tb05727.x>
- Shuja, A. (2018). *Patent No. US9981203B2*. United States.
- Silva, V., Igrejas, G., Falco, V., Santos, T. P., Torres, C., Oliveira, A. M. P., ... Poeta, P. (2018). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of phenolic compounds extracted from wine industry by-products. *Food Control*, 92, 516–522. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.05.031>
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144–158.
- Steenackers, B., De Cooman, L., & De Vos, D. (2015). Chemical transformations of characteristic hop secondary metabolites in relation to beer properties and the brewing process: A review. *Food Chemistry*, 172, 742–756. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.139>
- Szewczyk, K., Zidorn, C., Biernasiuk, A., Komsta, Ł., & Granica, S. (2016). Polyphenols from *Impatiens* (Balsaminaceae) and their antioxidant and antimicrobial activities. *Industrial Crops and Products*, 86, 262–272. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.03.053>
- Taylor, P., Mizobuchi, S., & Sato, Y. (1985). Antifungal activities of hop bitter resins and related compounds. *Agricultural and Biological Chemistry*, 49, 399–403. <https://doi.org/10.1080/00021369.1985.10866749>
- Teuber, M., & Schmalreck, A. F. (1973). Membrane leakage in *Bacillus subtilis* 168 induced by the hop constituents lupulone, humulone, isohumulone and humulinic acid. *Archiv Für Mikrobiologie*, 94, 159–171. <https://doi.org/10.1007/BF00416690>
- Toma, M., Vinatoru, M., Paniwnyk, L., & Mason, T. J. (2001). Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8(2), 137–142. [https://doi.org/10.1016/S1350-4177\(00\)00033-X](https://doi.org/10.1016/S1350-4177(00)00033-X)
- Tyśkiewicz, K., Gieysztor, R., Konkol, M., Szalas, J., & Rój, E. (2018). Essential oils from *Humulus Lupulus* scCO₂ extract by hydrodistillation and microwave-assisted hydrodistillation. *Molecules*, 23, 2866. <https://doi.org/10.3390/molecules23112866>
- Villalobos-Delgado, L. H., Caro, I., Blanco, C., Bodas, R., Andrés, S., Giráldez, F. J., & Mateo, J. (2015). Effect of the addition of hop (infusion or powder) on the oxidative stability of lean lamb patties during storage. *Small Ruminant Research*, 125, 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.02.008>
- Weber, N., Biehler, K., Schwabe, K., Haarhaus, B., Quirin, K. W., Frank, U., ... Wölflé, U. (2019). Hop extract acts as an antioxidant with antimicrobial effects against *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus aureus*. *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules24020223>
- Wiener, M. C., & Horanyi, P. S. (2011). How hydrophobic molecules traverse the outer membranes of Gram-negative bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(27), 10929–10930. <https://doi.org/10.1073/pnas.1106927108>

- Yam, T. ., Shah, S., & Hamilton-Miller, J. M. . (2006). Microbiological activity of whole and fractionated crude extracts of tea (*Camellia sinensis*), and of tea components. *FEMS Microbiology Letters*, *152*(1), 169–174. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb10424.x>
- Zanoli, P., & Zavatti, M. (2008). Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L . *Journal of Ethnopharmacology*, *116*, 383–396. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.01.011>

5. CONCLUSÃO

As cultivares brasileiras de lúpulo apresentaram características distintas quanto à composição química. Os extratos hidroetanólicos das variedades produzidas no Brasil evidenciaram conteúdos satisfatórios de compostos fenólicos e flavonoides, com destaque para a variedade “Canastra” que exibiu o maior conteúdo de fenóis totais dentre as demais cultivares, superando inclusive a variedade comercial em estudo. Os extratos apresentaram ainda um elevado potencial antioxidante.

A atividade antimicrobiana das cultivares brasileiras foi verificada frente bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A bactéria *Staphylococcus aureus* demonstrou grande susceptibilidade aos componentes dos cones de lúpulo. Os extratos de lúpulo evidenciaram ainda efeito antifúngico frente *Bysschlamys nivea*, com decaimento do diâmetro micelial conforme aumento da concentração avaliada. A concentração de 20 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ inibiu quase totalmente o crescimento fúngico.

Um elevado conteúdo de resinas moles foi verificado para os extratos hidroetanólicos das cultivares lúpulo produzidas no Brasil. Os extratos referentes às variedades Vitória, Columbus e “Canastra” exibiram teores excepcionais de α e β -ácidos, chegando a cerca de 60% da composição dos extratos hidroetanólicos de lúpulo.

Logo, a partir das características verificadas no presente estudo, as cultivares brasileiras de lúpulo demonstraram possuir elevado potencial de aplicação em diferentes setores da indústria. Novos estudos associados ao efeito do método de extração, bem como uma análise de demais constituintes químicos e propriedades biológicas seriam de grande valia para melhor conhecimento das cultivares produzidas no país.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Material suplementar (Artigo 2)

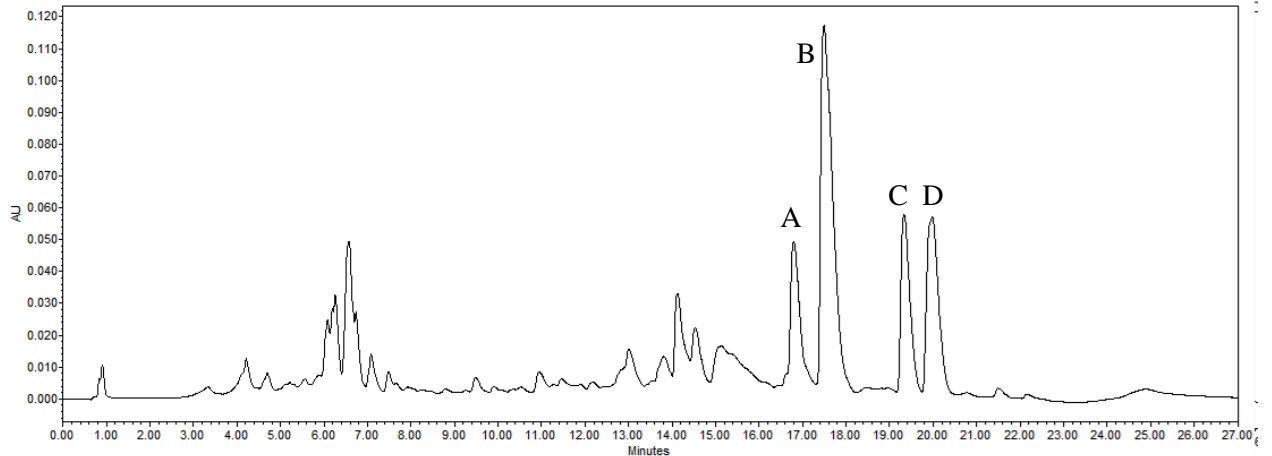


Figura 1. Cromatograma obtido por uPLC a 320 nm para o extrato hidroetanólico da cultivar Spalt com identificação de α - e β - ácidos (A: cohumulona; B: humulona+adhumulona; C: colupulona D: lupulona+adlupulona)

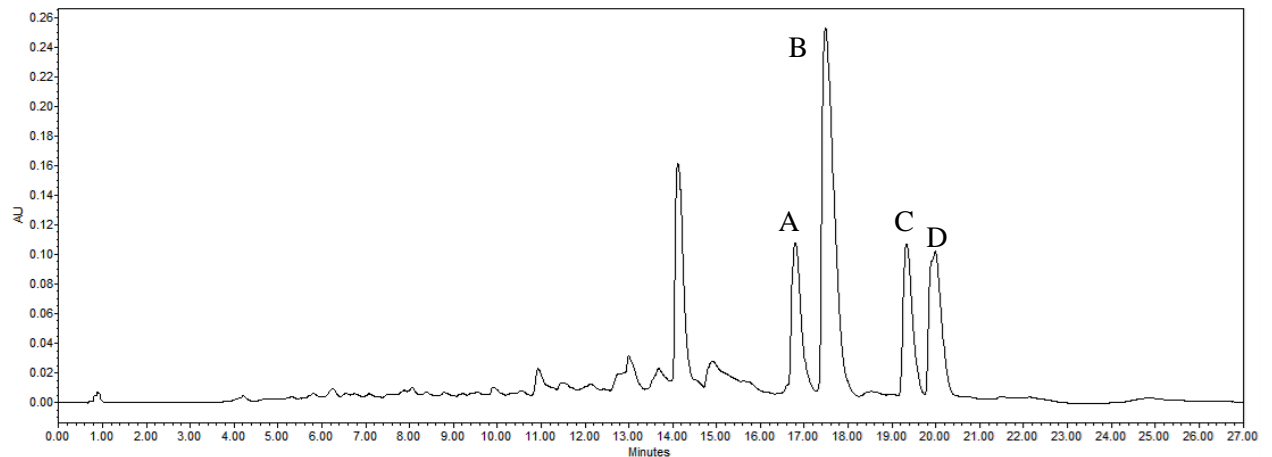


Figura 2. Cromatograma obtido por uPLC a 320 nm para o extrato hidroetanólico da cultivar Saaz com identificação de α - e β - ácidos (A: cohumulona; B: humulona+adhumulona; C: colupulona D: lupulona+adlupulona)

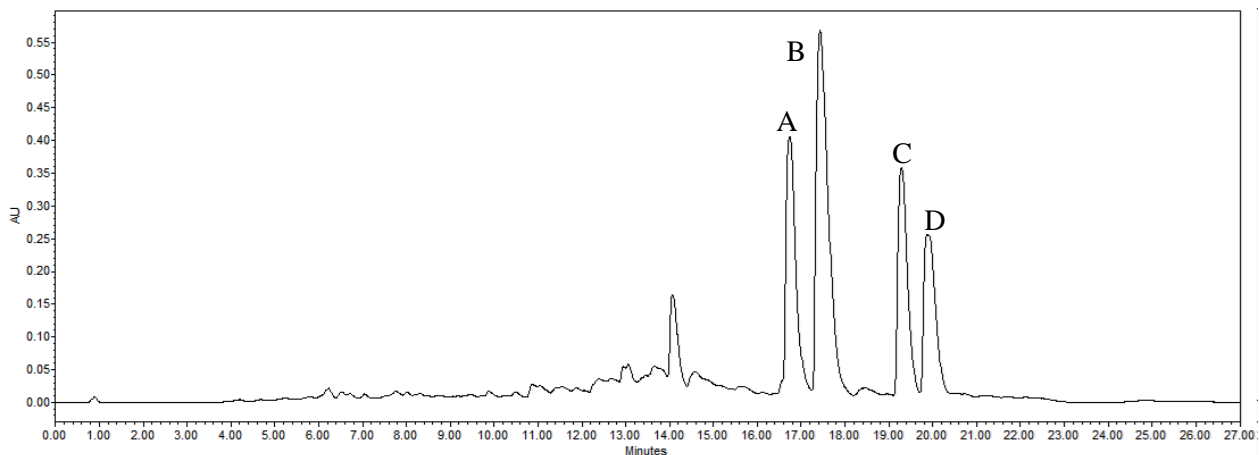


Figura 3. Cromatograma obtido por uPLC a 320 nm para o extrato hidroetanólico da cultivar Vitória com identificação de α - e β -ácidos (A: cohumulona; B: humulona+adhumulona; C: colupulona D: lupulona+adlupulona)

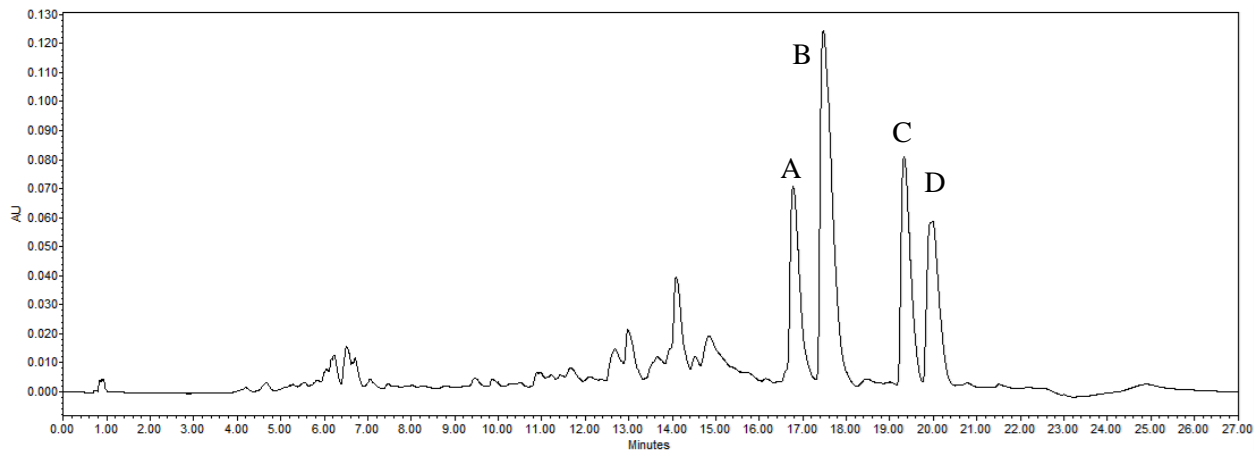


Figura 4. Cromatograma obtido por uPLC a 320 nm para o extrato hidroetanólico da cultivar Cascade com identificação de α - e β -ácidos (A: cohumulona; B: humulona+adhumulona; C: colupulona D: lupulona+adlupulona)

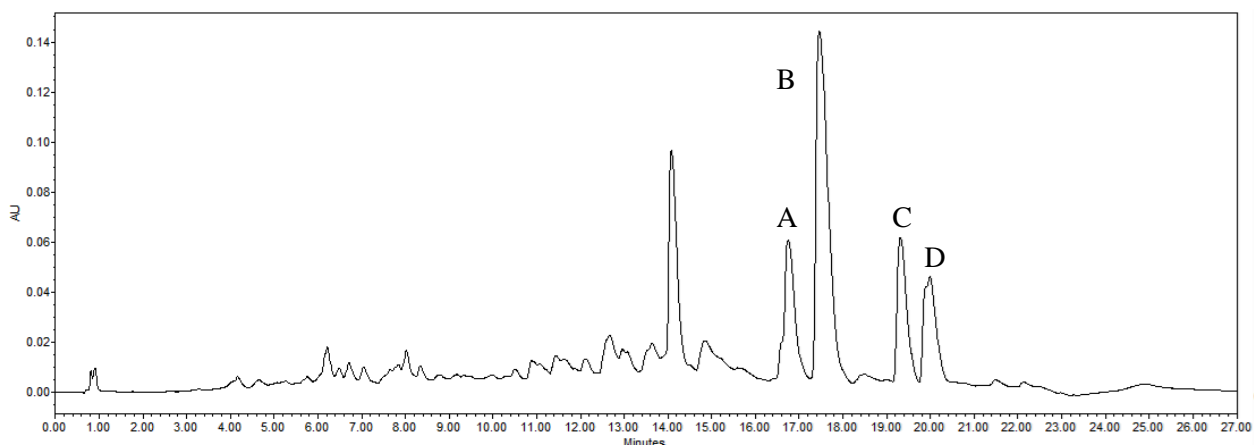


Figura 5. Cromatograma obtido por uPLC a 320 nm para o extrato hidroetanólico da cultivar Mantequeira com identificação de α - e β -ácidos (A: cohumulona; B: humulona+adhumulona; C: colupulona D: lupulona+adlupulona)

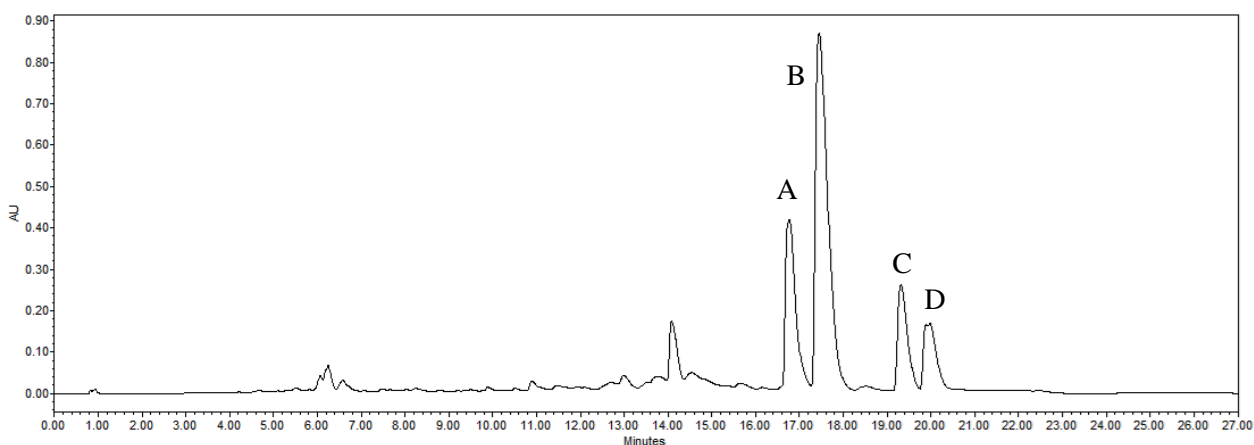


Figura 6. Cromatograma obtido por uPLC a 320 nm para o extrato hidroetanólico da cultivar Columbus com identificação de α - β -ácidos (A: cohumulona; B: humulona+adhumulona; C: colupulona D: lupulona+adlupulona)

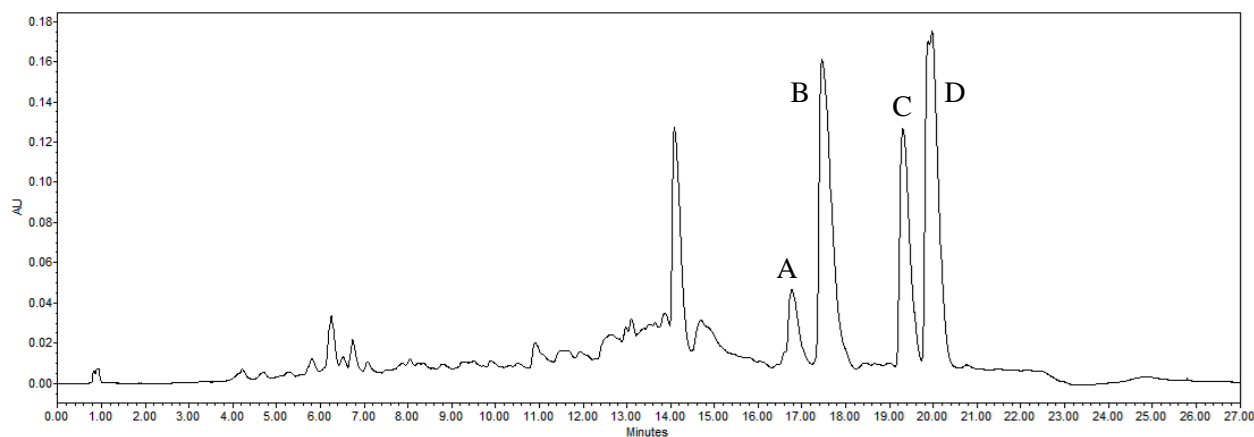


Figura 7. Cromatograma obtido por uPLC a 320 nm para o extrato hidroetanólico da cultivar Brazylijsk com identificação de α - e β -ácidos (A: cohumulona; B: humulona+adhumulona; C: colupulona D: lupulona+adlupulona)

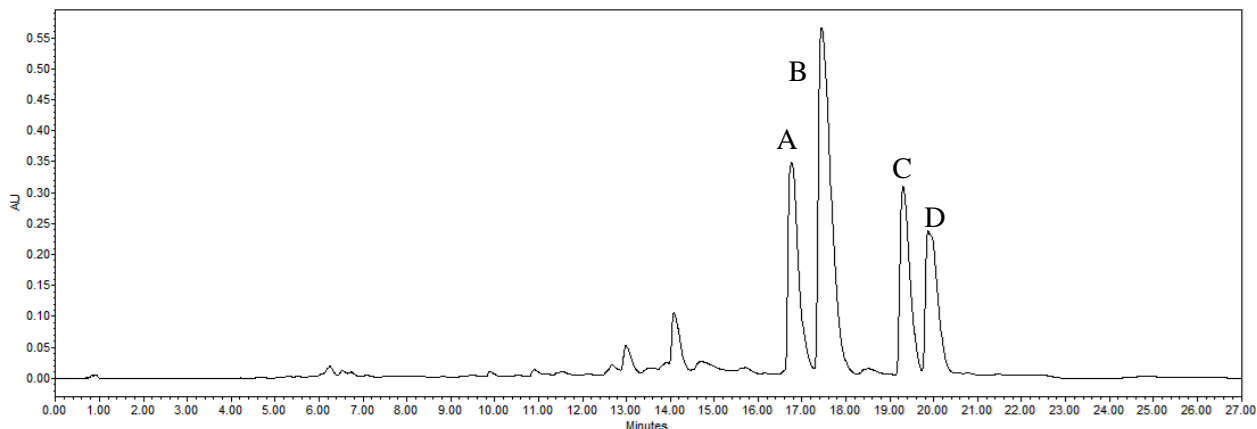


Figura 8. Cromatograma obtido por uPLC a 320 nm para o extrato hidroetanólico da cultivar “Canastra” com identificação de α - e β -ácidos (A: cohumulona; B: humulona+adhumulona; C: colupulona D: lupulona+adlupulona)

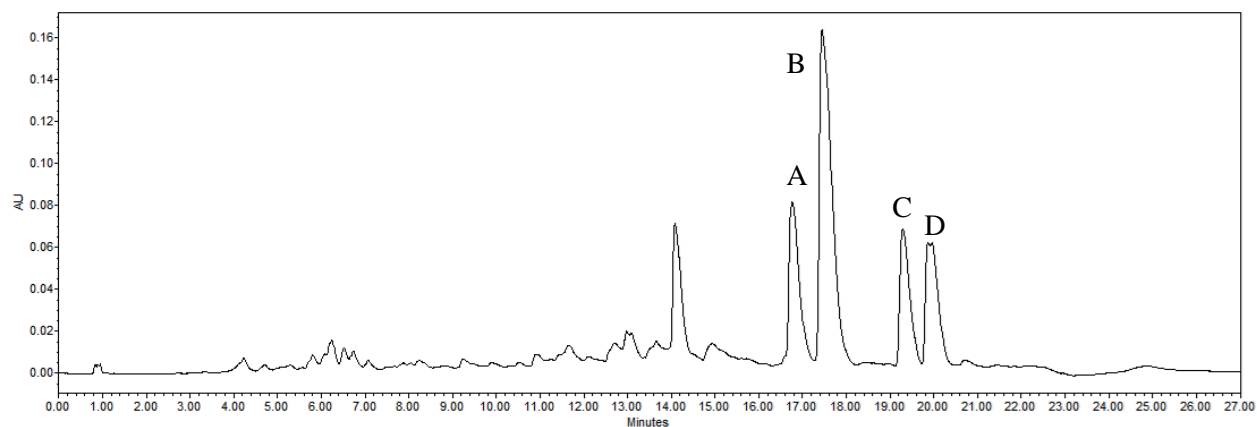


Figura 9. Cromatograma obtido por uPLC a 320 nm para o extrato hidroetanólico da cultivar Halertau Mittelfrüh com identificação de α - e β -ácidos (A: cohumulona; B: humulona+adhumulona; C: colupulona D: lupulona+adlupulona)

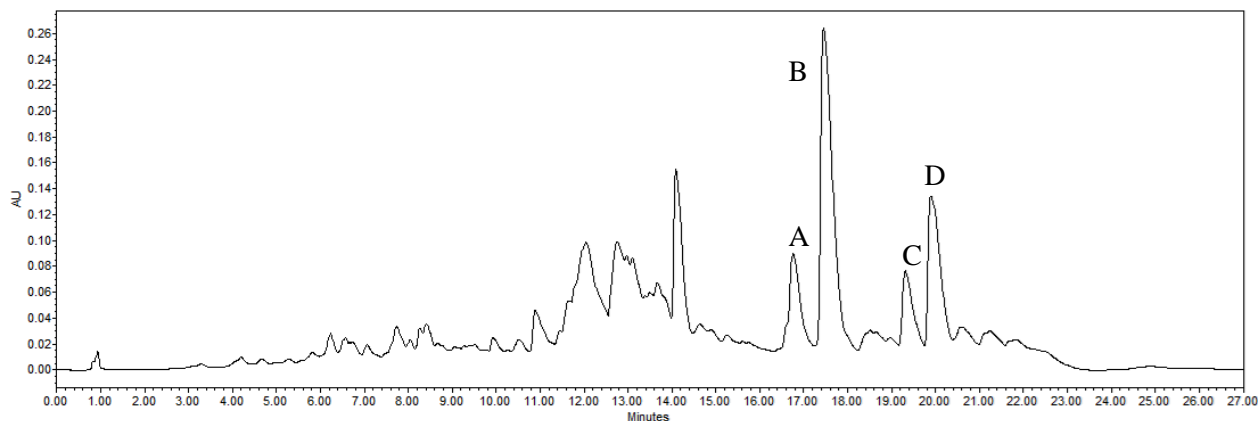


Figura 10. Cromatograma obtido por uPLC a 320 nm para o extrato hidroetanólico da cultivar Premiant com identificação de α - e β -ácidos (A: cohumulona; B: humulona+adhumulona; C: colupulona D: lupulona+adlupulona)

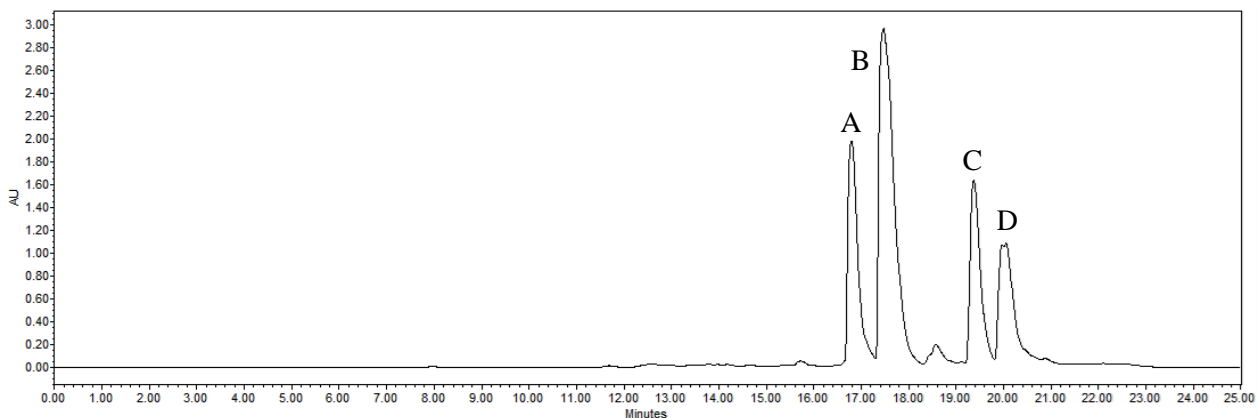


Figura 11. Cromatograma obtido por uPLC a 320 nm referente ao padrão para α - e β -ácidos (A: cohumulona; B: humulona+adhumulona; C: colupulona D: lupulona+adlupulona)