



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

CAROLINE DE SOUZA MOTTA

**ATIVIDADES ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DE EXTRATOS DE LÚPULOS
(*Humulus lupulus* L.) CULTIVADOS NO BRASIL**

ALEGRE – ES

Novembro 2022

CAROLINE DE SOUZA MOTTA

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DE EXTRATOS DE LÚPULOS
(*Humulus lupulus* L.) CULTIVADOS 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
Coorientadores: Prof^a. Dra. Patrícia Fontes Pinheiro
Dr. Denes Kaic Alves do Rosário

ALEGRE – ES
NOVEMBRO 2022

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

M921a Motta, Caroline de Souza, 1995 -
Atividade antimicrobiana e antibiofilme de extratos de
lúpulos (*Humulus lupulus* L.) cultivados no Brasil / Caroline de
Souza Motta. - 2022.
53 f. : il.

Orientadora: Patrícia Campos Bernardes.
Coorientador: Denes Kaic Alves do Rosário.
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.

1. Compostos bioativos. 2. Bactérias patogênicas.
3. Microbiologia. I. Bernardes, Patrícia Campos. II. Rosário, Denes Kaic Alves do. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. IV. Título.

CDU: 664

CAROLINE DE SOUZA MOTTA

**“ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DE EXTRATOS DE LÚPULOS
(*Humulus lupulus* L.) CULTIVADOS 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 24 de novembro de 2022.

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

Prof^ª. Dr^ª. Patrícia Fontes Pinheiro
Universidade Federal de Viçosa - UFV
Coorientadora

Prof^ª. Dr^ª. Jackline Freitas Brilhante de São José
Universidade Federal do Espírito Santo - UFES
Examinadora Externa

Prof^ª. Dr^ª. Emiliane Andrade Araújo Nunes
Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM
Examinadora Externa





Documentos Defesa de Dissertação - Caroline de Souza Motta

Data e Hora de Criação: 24/11/2022 às 16:07:36

Documentos que originaram esse envelope:

- 113ª Ata Defesa de Dissertação - Caroline de Souza Motta.pdf (Arquivo PDF) - 1 página(s)
- Folha de Aprovação Defesa - Caroline de Souza Motta.pdf (Arquivo PDF) - 1 página(s)
- Folha de Rosto Defesa Dissertação - Caroline de Souza Motta.pdf (Arquivo PDF) - 1 página(s)



Hashs únicas referente à esse envelope de documentos

[SHA256]: 9f66a4b62ba16f33e82a8966a39890c0586c77da50a64ccdf2ceb742137bd5d3

[SHA512]: 0cefcbcebae7e2d2c2dcc39992510f9be22ed54f12be7e76fcf360c42d70fb32b8f3bac11c6316aed79230c4131bcf6a74274aa65e871d9ac1615485680ed685

Lista de assinaturas solicitadas e associadas à esse envelope



ASSINADO - Patricia Campos Bernardes (patricia.bernardes@ufes.br)

Data/Hora: 24/11/2022 - 16:13:21, IP: 179.109.143.237, Geolocalização: [-22.353426, -42.707610]

[SHA256]: 8cc235093857a5a1657c4ba323c7e951b6d431c18f2274e25ec37a06ee5f1836



ASSINADO - Patricia Fontes (patricia.pinheiro@ufv.br)

Data/Hora: 24/11/2022 - 16:24:34, IP: 177.98.192.217

[SHA256]: 5794a487028602837f01e3169ef408646ffb13945bb0ffb1345b32ec945c22a0



ASSINADO - Jackline Freitas (jackline.jose@ufes.br)

Data/Hora: 24/11/2022 - 16:51:54, IP: 187.36.173.71

[SHA256]: 8565f501123c4cd70f1238f935ed2fc4330fe3d7627dcb997db3ae3dbe30c12



ASSINADO - Emiliane (emiliane.naves@uftm.edu.br)

Data/Hora: 24/11/2022 - 19:08:58, IP: 177.191.169.230, Geolocalização: [-19.5483, -47.9414]

[SHA256]: 445052ec045aa95d53e959dd3ba30d49f916f9f90073f41f28638c844c8daf58

Histórico de eventos registrados neste envelope

24/11/2022 19:08:58 - Envelope finalizado por emiliane.naves@uftm.edu.br, IP 177.191.169.230

24/11/2022 19:08:58 - Assinatura realizada por emiliane.naves@uftm.edu.br, IP 177.191.169.230

24/11/2022 19:08:39 - Envelope visualizado por emiliane.naves@uftm.edu.br, IP 177.191.169.230

24/11/2022 16:51:54 - Assinatura realizada por jackline.jose@ufes.br, IP 187.36.173.71

24/11/2022 16:24:34 - Assinatura realizada por patricia.pinheiro@ufv.br, IP 177.98.192.217

24/11/2022 16:13:21 - Assinatura realizada por patricia.bernardes@ufes.br, IP 179.109.143.237

24/11/2022 16:13:06 - Envelope visualizado por patricia.bernardes@ufes.br, IP 179.109.143.237

24/11/2022 16:11:41 - Envelope registrado na Blockchain por patricia.bernardes@ufes.br, IP 179.109.143.237

24/11/2022 16:11:39 - Envelope encaminhado para assinaturas por patricia.bernardes@ufes.br, IP 179.109.143.237

24/11/2022 16:07:39 - Envelope criado por patricia.bernardes@ufes.br, IP 179.109.143.237

AGRADECIMENTOS

A Deus, sou muito grata pela vida e pela presença constante. Por ser meu refúgio nas adversidades, e por me conceder o necessário para concluir mais uma etapa.

À Universidade Federal do Espírito Santo e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade.

À CAPES, pela concessão da bolsa.

À querida professora Patrícia Campos Bernardes pela orientação, confiança, disponibilidade sem igual e estímulo de sempre buscar conhecimento.

Aos meus coorientadores Denes Kaic Alves do Rosário e Patrícia Fontes Pinheiro pelas considerações, incentivo e sugestões realizadas para melhoria deste trabalho.

À produtora e pesquisadora Teresa Yoshiko, que gentilmente disponibilizou o lúpulo utilizado neste estudo.

À minha família pelas idas e vindas à Alegre e por tudo que sempre fizeram pra possibilitar e apoiar meus estudos. Agradeço por todo carinho e cuidado a mim dispensados. Em especial à minha mãe Viviam e minha avó Miriam, agradeço por todo amor e orações constantes.

Às amigas de longa data Thayná e Luana, pelo companheirismo que sempre trouxeram e por se fazerem presentes, mesmo distantes. À Keila e Gustavo pela companhia, pelos momentos diários de descontração e ajuda no laboratório. Em especial ao Bruno por todas as conversas, apoio e incentivo sempre concedidos. Ao Gustavo Oliveira pelo constante suporte e pelos momentos de leveza e alegria compartilhados.

Ao secretário do PCTA, Toninho, por toda atenção e paciência dispensadas. Aos técnicos Maurício, Letícia e Mayara pela disponibilidade diária. Ao professor Michel Picanço pelas análises de microscopia. À aluna de iniciação científica, Emanuelle Garcia, pela ajuda e companhia na execução das análises.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram ao longo do caminho para finalização desta etapa.

Muito obrigada!

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Adesão de (a) *L. monocytogenes* ATCC 7644; (b) *S. aureus* ATCC 6538; (c) *E. coli* ATCC 11229; (d) *S. Typhimurium* ATCC 14028 e (e) *P. aeruginosa* ATCC 15442, em %, submetidas a diferentes concentrações subinibitórias de extratos de lúpulo das variedades Comet, Polaris e Brewers Gold.....19
- Figura 2. Curvas de crescimento de *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *S. aureus* ATCC 6538 na presença de diferentes concentrações de extratos de lúpulo das variedades (a) Comet, (b) Polaris e (c) Brewers Gold.21
- Figura 3. Concentração de glicose ($\mu\text{g/mL}$) presente no EPS extraído de biofilmes de *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *S. aureus* ATCC 6538 submetidas a diferentes concentrações subinibitórias de extratos de lúpulo das variedades Comet, Polaris e Brewers Gold.....24
- Figura 4. Micrografias de *Listeria monocytogenes* após 144h de incubação na ausência (Controle) e aplicação de extratos de lúpulo das variedades Comet (C), Polaris (P) e Brewers Gold (BG) em diferentes concentrações subinibitórias: $0,5\text{mg.mL}^{-1}$ e 1mg.mL^{-1}25
- Figura 5. Micrografias de *Staphylococcus aureus* após 144h de incubação na ausência (Controle) e aplicação de extratos de lúpulo das variedades Comet (C), Polaris (P) e Brewers Gold (BG) em diferentes concentrações subinibitórias: $0,5\text{mg.mL}^{-1}$ e 1mg.mL^{-1} 27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Teores de α -ácidos e β -ácidos das cultivares de lúpulo (média \pm desvio padrão).....	17
Tabela 2. Diâmetros das zonas de inibição, em mm, dos extratos de três variedades de lúpulo frente a cinco bactérias patogênicas (média \pm desvio padrão) obtidas pelo teste do halo de inibição.....	17
Tabela 3. Duração da fase lag (lag), taxa máxima de crescimento (μ máx), e densidade de células na fase estacionária (DCFE) de <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644 e <i>S. aureus</i> ATCC 6538 na presença de diferentes concentrações de extratos de lúpulos (média \pm desvio padrão).....	22

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. ARTIGO ORIGINAL	7
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE LÚPULOS (<i>Humulus lupulus</i> L.) CULTIVADOS NO BRASIL E EFEITO ANTIADESÃO CONTRA <i>LISTERIA</i> <i>MONOCYTOGENES</i> E <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	7
4. CONCLUSÃO	41
APÊNDICE	42

RESUMO

“MOTTA, Caroline de Souza”. **Atividade antimicrobiana e antibiofilme de extratos de lúpulos (*Humulus lupulus* L.) cultivados no Brasil**. 2022. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre – ES. Orientador: Prof^a. Dra. Patrícia Campos Bernardes. Coorientadores: Prof^a. Dra. Patrícia Fontes Pinheiro, Prof. Dr. Denes Kaic Alves do Rosário.

A formação e permanência de biofilmes na cadeia produtiva alimentícia configuram um fator importante na incidência de doenças veiculadas por alimentos. Conseqüentemente, a investigação de agentes inibidores de biofilme se tornou uma área fundamental de pesquisa. A atividade antimicrobiana do lúpulo (*Humulus lupulus* L.) já é conhecida. Entretanto, apesar de ser uma cultura com grande potencial de crescimento no país, as informações existentes sobre as propriedades antimicrobianas de lúpulos cultivados no Brasil ainda são exíguas. Este estudo avaliou as atividades antimicrobiana e antibiofilme de extratos hidroetanólicos de lúpulos das variedades Comet, Polaris e Brewers Gold, produzidas no Brasil. Foram realizadas análises de determinação da Concentração Mínima Inibitória dos extratos, teste do halo de inibição, ensaio de adesão com cristal violeta, quantificação de exopolissacarídeos e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Os teores de α - e β - ácidos encontrados variaram entre 0,39 a 1,07%. As bactérias Gram-positivas demonstraram maior suscetibilidade aos extratos comparadas às Gram-negativas. O ensaio de adesão com cristal violeta revelou atividade antiadesão expressiva frente a *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella* Typhimurium. O extrato da variedade Comet reduziu em 95% e 90% a adesão de *S. aureus* e *S. Typhimurium*, respectivamente. Extratos das três variedades reduziram significativamente a produção de exopolissacarídeos por *S. aureus*. As micrografias obtidas por MEV mostram redução na concentração de células e danos à membrana celular, confirmando os efeitos antibacterianos e antiadesão dos extratos de lúpulo. Estes resultados endossam o potencial de utilização de lúpulos cultivados no Brasil como agente antiadesão no controle da formação de biofilmes na indústria alimentícia.

Palavras-chave: extrato de lúpulo, lúpulo brasileiro, atividade antimicrobiana, atividade antibiofilme, bactérias patogênicas.

ABSTRACT

MOTTA, Caroline de Souza. **Antimicrobial and antibiofilm activity of hop extracts (*Humulus lupulus* L.) cultivated in Brazil.** 2022. 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. Dr. Denes Kaic Alves do Rosário.

Biofilms formation and permanence in food production chain is an important factor in the incidence of foodborne diseases. Consequently, the study of biofilm inhibitory agents has become a fundamental area of research. The antimicrobial activity of hop (*Humulus lupulus* L.) is already known. However, despite being a crop with great growth potential in the country, the existing information about the antimicrobial properties of hops grown in Brazil is still scarce. This study evaluated the antimicrobial and antibiofilm activities of hydroethanolic extracts of hops from Comet, Polaris and Brewers Gold varieties, produced in Brazil. Analyzes were performed to determine the Minimum Inhibitory Concentration of the extracts, inhibition halo test, anti-adhesion activity with crystal violet, exopolysaccharides quantification, and Scanning Electron Microscopy (SEM). The α - and β - acids levels ranged from 0.39 to 1.07%. Gram-positive bacteria showed greater susceptibility to extracts when compared to Gram-negative ones. The crystal violet adhesion assay revealed expressive anti-adhesion activity against *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium. Comet variety extract reduced the adhesion of *S. aureus* and *S. Typhimurium* by 95% and 90%, respectively. Extracts of the three varieties significantly reduced the exopolysaccharide production by *S. aureus*. The micrographs obtained by SEM show a reduction in cell concentration and damage to the cell membrane, confirming hop extracts' antibacterial and antiadhesion effects. These results support the potential of using hops grown in Brazil as an anti-adhesion agent to control biofilm formation in the food industry.

Key-words: Brazilian hops, hop extract, antimicrobial activity, antibiofilm activity, pathogenic bacteria.

1. INTRODUÇÃO

Uma questão preocupante para os órgãos de saúde pública e para a indústria alimentícia é a persistência de patógenos em superfícies na indústria de alimentos, podendo levar à contaminação de matrizes alimentares (Nahar et al., 2021). De acordo com a Organização Mundial da Saúde, as doenças de origem alimentar são causas importantes de mortalidade. Estima-se que, anualmente, 600 milhões de pessoas contraem doenças resultantes do consumo de alimentos contaminados e, dessas, cerca de 420 mil morrem (WHO, 2022).

Entre as bactérias patogênicas mais comumente relacionadas a surtos causados pela ingestão de alimentos contaminados encontram-se *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, que também são conhecidas por serem capazes de formar biofilmes (FDA, 2021; Giaouris et al., 2015).

Os biofilmes são ecossistemas tridimensionais complexos formados por uma ou mais espécies de microrganismos que se aderem a uma superfície por meio de uma substância polimérica extracelular (EPS) autoproduzida (Giaouris et al., 2015; Verderosa, Totsika, Fairfull-Smith, 2019).

A matriz de EPS é composta principalmente por polissacarídeos. Apesar de sua função estrutural e protetora, também está envolvida em mecanismos de difusão de oxigênio, transporte de água e nutrientes e, transferência de moléculas de comunicação celular, que favorecem a sobrevivência estável dessas comunidades de microrganismos (Flemming et al., 2016; Yousef, Juneja, 2003).

O caráter multiespécie de uma comunidade de biofilme apresenta vantagens importantes para sua sobrevivência em um ambiente industrial. Pode, por exemplo, facilitar a fixação dos microrganismos em uma superfície, seja ela abiótica como superfícies de equipamentos, processamento, embalagem; seja ela biótica, como carnes, ossos, frutas, hortaliças, entre outros. Também pode resultar em maiores tolerâncias a forças mecânicas, físicas e químicas, como desinfetantes, em comparação com microrganismos que estão em um estado planctônico (Galié et al., 2018; Yousef, Juneja, 2003).

Devido a percepção negativa dos consumidores em relação ao uso de compostos químicos sintéticos no controle da formação de biofilmes, os compostos naturais têm ganhado um interesse crescente por parte de pesquisadores. Diversos

estudos têm sido realizados a fim de avaliar a eficácia da utilização de compostos bioativos naturais, principalmente de origem vegetal, que possuam ação antimicrobiana sobre biofilmes, no intuito de controlar e prevenir biofilmes formados por patógenos alimentares, garantindo a qualidade microbiológica de diferentes produtos alimentícios (Bakkiyaraj, 2013; Braunlich et al., 2013; Molina et al., 2020).

O lúpulo (*Humulus lupulus* L.) é uma planta perene pertencente à família Cannabaceae (Zanoli; Zavatti, 2008). É cultivado para uso comercial, principalmente para produção de cerveja, devido às suas características sensoriais como amargor e aspectos aromáticos. Essas características são proporcionadas por metabólitos secundários da planta, como alfa e beta ácidos, compostos fenólicos e óleos essenciais (Alonso-Esteban et al., 2019).

Além das características sensoriais de amargor e aroma, os extratos de lúpulo possuem atividade antioxidante e antimicrobiana relacionados aos constituintes supracitados presentes na planta. Diversos compostos bioativos como lupulonas, humulonas, cohumulonas, rutina, ácido clorogênico, ácido gálico, epicatequinas, xanthohumol e isoxanthohumol já foram identificados no lúpulo e estão associados ao potencial antioxidante e antimicrobiano *in vitro* (Arruda et al., 2021; Keskin et al., 2019; Wang et al., 2014).

A fim de garantir o cultivo de lúpulo com garantia de identidade e qualidade, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) já registrou 50 cultivares de lúpulo para produção, comercialização e propagação de mudas dessa planta no Brasil (BRASIL, 2017).

Entre estas variedades, a Comet é a segunda mais plantada, representando cerca de 10,2% da parcela cultivada (APROLÚPULO, 2021). É uma variedade nativa americana, com produção aproximada de 285,7 toneladas nos Estados Unidos em 2021 (Georgensgmueund, 2021; Hopsteiner, 2020). Lançada em 2012 pelo Instituto de Pesquisa de Lúpulo, em Hüll, a variedade Polaris está entre as mais cultivadas na Alemanha. O país teve uma produção de, aproximadamente 689 toneladas em 2021 (Georgensgmueund, 2021; Hopsteiner, 2020). A variedade Brewers Gold é resultado de uma polinização aberta com um lúpulo selvagem de Manitoba (BB1) selecionado por Salmon em 1919 (Hopsteiner, 2020; USDA, 2007).

1.1 Referências bibliográficas

- Alonso-Esteban, J. I.; Pinela, J.; Barros, L.; Ćirić, A.; Soković, M.; Calhella, R. C.; Torija-Isasa, E.; De Cortes, M. S-M.; Ferreira, I. C. F. R. Phenolic composition and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic properties of hop (*Humulus lupulus* L.) Seeds. **Industrial Crops and Products**, v. 134, n. February, p. 154–159, 2019. DOI:10.1016/j.indcrop.2019.04.001.
- Aprolúpulo. **Levantamento estatístico Aprolúpulo 2021**. Associação Brasileira dos Produtores de Lúpulo, [s.l.]. 01 de jan. de 2021. Disponível em: <<https://www.aprolupulo.com.br/blog/levantamento-estatistico-aprolupulo-2021>>. Acesso em: 13 ago. 2022.
- Arruda, T. R.; Pinheiro, P. F.; Silva, P. I.; Bernardes, P. C. A new perspective of a well-recognized raw material: Phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities and α - and β -acids profile of Brazilian hop (*Humulus lupulus* L.) extracts. **Lwt**, v. 141, n. January, p. 110905, 2021. DOI: 10.1016/j.lwt.2021.110905.
- Bakkiyaraj, D.; Nandhini, J. R.; Malathy, B.; Pandian, S. K. The anti-biofilm potential of pomegranate (*Punica granatum* L.) extract against human bacterial and fungal pathogens. **Biofouling**, v. 29, n. 8, p. 929–937, set. 2013. DOI: 10.1080/08927014.2013.820825
- Braunlich, M.; Økstad, O. A.; Slimestad, R.; Wangensteen, H.; Malterud, K. E.; Barsett, H. Effects of *Aronia melanocarpa* constituents on biofilm formation of *Escherichia coli* and *Bacillus cereus*. **Molecules**, v. 18, n. 12, p. 14989–14999, 2013. DOI: 10.3390/molecules181214989.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Registro Nacional de Cultivares (RNC). 2017. Disponível em: <https://sistemas.agricultura.gov.br/snpc/cultivarweb/cultivares_registradas.php>. Acesso em: 07 out. 2022.
- FDA. Food and Drug Administration. **Outbreaks of Foodborne Illness**. 2021. Disponível em: <<https://www.fda.gov/food/recalls-outbreaks-emergencies/outbreaks-foodborne-illness>>. Acesso em: 07 out. 2022.

- Flemming, H-C.; Wingender, J.; Ulrich, S.; Steinberg, P.; Rice, S. A.; Kjelleberg, S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 13, 2016. DOI: 10.1038/nrmicro.2016.94
- Galié, S.; García-Gutiérrez, C.; Miguélez, E. M.; Villar, C. J.; Lombó, F. Biofilms in the food industry: Health aspects and control methods. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. MAY, p. 1–18, 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00898.
- Georgensgmuend, H. M. **BarthHaas Report 2021/2022**. Nuremberg, 2022. Disponível em: <<https://www.barthhaas.com/en/campaign/barthhaas-report-2022/>>. Acesso em: 13 ago. 2022.
- Giaouris, E.; Heir, E.; Desvaux, M.; Hébraud, M.; Møretrø, T.; Langsrud, S.; Doulgeraki, A.; Nychas, G. J.; Kacániová, M.; Czaczyk, K.; Ölmez, H.; Simões, M. Intra- and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. JUL, p. 1–26, 2015. a. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00841.
- Hopsteiner. **Hop Variety Data Sheet**, [s.l.]. 01 de set. de 2020. Disponível em: <<https://www.hopsteiner.com/variety-data-sheets/>>. Acesso em: 07 out. 2022.
- Keskin, Ş.; Şirin, Y.; Çakir, H. E.; Keskin, M. An investigation of *Humulus lupulus* L.: Phenolic composition, antioxidant capacity and inhibition properties of clinically important enzymes. **South African Journal of Botany**, v. 120, p. 170–174, 2019. DOI: 10.1016/j.sajb.2018.04.017.
- Molina, R. D. I.; Campos-Silva, R.; Macedo, A. J.; Blázquez, M. A.; Alberto, M. R.; Arena, M. E. Antibiofilm activity of coriander (*Coriander sativum* L.) grown in Argentina against food contaminants and human pathogenic bacteria. **Industrial Crops and Products**, v. 151, n. November 2019, p. 112380, 2020. DOI: 10.1016/j.indcrop.2020.112380.
- Nahar, S.; Ha, A. J. W.; Byun, K. H.; Hossain, M. I.; Mizan, M. F. R.; Ha, Sang D. Efficacy of flavourzyme against *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms on food-contact surfaces. **International Journal of Food Microbiology**, v. 336, n. July 2020, p. 108897, 2021. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108897.

- USDA. United States Department of Agriculture. **Hop Cultivar Descriptions**. 2007. Disponível em: <<https://www.ars.usda.gov/ARSTUserFiles/2450/hopcultivars/19001.html>>. Acesso em: 07 out. 2022.
- Verderosa, A. D.; Totsika, M; Fairfull-Smith, K. E. Bacterial Biofilm Eradication Agents: A Current Review. **Frontiers in Chemistry**, v. 7, n. November, p. 1–17, 2019. DOI: 10.3389/fchem.2019.00824.
- Wang, X.; Yang, L.; Yang, X.; Tian, Y. In vitro and in vivo antioxidant and antimutagenic activities of polyphenols extracted from hops (*Humulus lupulus* L.). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [S. l.], v. 94, n. 8, p. 1693–1700, 2014. DOI: 10.1002/jsfa.6534.
- WHO. World and Health Organization. **Food safety**. 2022. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>>. Acesso em:
- Yousef, A. E.; Juneja, V. K. **Microbial stress adaptation and food safety**. [s.l.]: CRC Press, 2003.
- Zanoli, P.; Zavatti, M. Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, n. 3, p. 383–396, 2008. a. DOI: 10.1016/j.jep.2008.01.011

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme de extratos hidroetanólicos de lúpulo (*Humulus lupulus L.*), das cultivares Comet, Polaris e Brewers Gold, produzidas no Brasil.

2.2. Objetivos específicos

- a) Obter extratos hidroetanólicos de cones de lúpulo e determinar os teores de α - e β -ácidos;
- b) Averiguar atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos obtidos frente a *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium e *Pseudomonas aeruginosa*;
- c) Avaliar atividade antiadesão dos extratos de lúpulo frente a *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium e *Pseudomonas aeruginosa*;
- d) Analisar influência dos extratos na produção de substância polimérica extracelular (EPS) por *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*;
- e) Determinar a influência de concentrações sub-inibitórias dos extratos na multiplicação de *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*;
- f) Observar mudanças estruturais causadas nas células e nos biofilmes de *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* pela aplicação dos extratos obtidos.

3. ARTIGO ORIGINAL

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE LÚPULOS (*Humulus lupulus*
L.) CULTIVADOS NO BRASIL E EFEITO ANTIADESÃO CONTRA *LISTERIA*
MONOCYTOGENES E *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

**Caroline de Souza Motta¹, Emanuelle Rodrigues Garcia¹, Bruno Dutra da Silva ²,
Denes Kaic Alves do Rosário¹, Patrícia Fontes Pinheiro³, Patrícia Campos Bernardes^{1*}**

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

²Departamento de Bioquímica, Laboratório Avançado de Análises em Bioquímica e Biologia Molecular / Núcleo de Análises de Alimentos (NAL), Laboratório de Suporte de Desenvolvimento Tecnológico (LADETEC), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Cidade Universitária, Rio de Janeiro, RJ, 21941-909, Brasil.

³Departamento de Química e Física, Universidade Federal de Viçosa, Campus Universitário, 36570-900, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

***Autor Correspondente:** 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

Biofilms formation and permanence in food production chain is an important factor in foodborne diseases. Consequently, the discovery of biofilm inhibitory agents has become a fundamental area of research. The antimicrobial capacity of hop (*Humulus lupulus* L.) is already known. However, despite being a crop with great growth potential in the country, the existing information about the antimicrobial properties of hops grown in Brazil is still scarce. This study evaluated the antimicrobial and antiadhesion activities of hydroethanolic extracts of hops from Comet, Polaris and Brewers Gold varieties, produced in Brazil. Analyzes were performed to determine the Minimum Inhibitory Concentration of the extracts, inhibition halo test, anti-adhesion activity with crystal violet, exopolysaccharides quantification, and Scanning Electron Microscopy (SEM). The α - and β - acids levels ranged from 0.39 to 1.07%. Gram-positive bacteria showed greater susceptibility to extracts when compared to Gram-negative ones. The crystal violet adhesion assay revealed expressive anti-adhesion activity against *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium. Comet variety extract reduced the adhesion of *S. aureus* and *S. Typhimurium* by 95% and 90%, respectively. Extracts of the three varieties significantly reduced the exopolysaccharide production by *S. aureus*. The micrographs obtained by SEM show a reduction in cell concentration and damage to the cell membrane, confirming hop extracts' antibacterial and antiadhesion effects. These results support the potential of using hops grown in Brazil as an anti-adhesion agent to control biofilm formation in the food industry.

Key-words: hop, Brazilian hops, antimicrobial activity, antibiofilm activity, foodborne pathogenic bacteria.

1 Introdução

Na natureza, a forma mais comum da existência de bactérias é em forma de biofilme. Essas comunidades podem ser formadas por uma ou mais espécies de bactérias e possuem uma estrutura tridimensional complexa, composta por uma matriz polimérica extracelular (EPS) que permite sua fixação em superfícies bióticas e abióticas (Giaouris et al., 2015; Lianou et al., 2020; Verderosa et al., 2019).

A matriz de EPS é composta principalmente por polissacarídeos, ácido nucleicos, proteínas e lipídeos. Além de ser responsável pela fixação, também possui função estrutural, protetora, está envolvida em mecanismos de difusão de oxigênio, transporte de água e nutrientes e transferência de moléculas de comunicação celular, a fim de favorecer a resistência para sobrevivência dos microrganismos presentes nessa comunidade (Flemming et al., 2016; Yousef e Juneja, 2003).

Grande parte dos patógenos veiculados por alimentos são capazes de formar biofilmes e, dessa forma, contaminar superfícies ao longo de toda cadeia produtiva da indústria de alimentos. *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* estão entre as bactérias patogênicas mais comumente relacionadas a surtos de infecções e intoxicações humanas relacionadas ao consumo de alimentos contaminados, sendo reconhecidos como problema de saúde pública (Bridier et al., 2015; FDA, 2021; Giaouris et al., 2015; Zhang et al., 2022). Dessa forma, a prevenção de biofilmes é um desafio para a indústria de alimentos.

Vegetais, principalmente as ervas, são amplamente utilizadas há muitos anos devido à suas propriedades bioativas. A partir do século XIX, químicos sintéticos começaram a ser utilizados para as mesmas finalidades. No entanto, devido à uma preocupação progressiva com a saúde, consumidores adotaram uma postura negativa diante do uso desses compostos, tornando a utilização de produtos naturais novamente uma tendência (Javan et al., 2019). Tal comportamento refletiu em crescente interesse de pesquisadores pelas propriedades de compostos bioativos de origem vegetal e eficiência da sua aplicação para garantia de qualidade e segurança de alimentos.

A produção mundial de lúpulo (*Humulus lupulus* L.) é quase exclusivamente utilizada na fabricação de cerveja com a finalidade de conferir amargor, aromatizar e conservar essa bebida. Porém, alguns compostos presentes nessa planta chamam atenção por suas propriedades antioxidantes, antibacterianas, antibiofilme e até mesmo quimiopreventivas e quimioterápicas (Arruda et al., 2021; di Lodovico et al., 2020; Moir, 2000; Steenackers et al., 2015).

As principais classes estruturais que compõem os cones de lúpulo incluem ácidos amargos, terpenos e chalconas. Os principais representantes dos ácidos amargos (ou resinas moles), que são apontados como os principais responsáveis pela atividade antibacteriana dessa planta são os α - e β -ácidos e seus derivados análogos. Eles se encontram presentes no lúpulo na forma de uma mistura com composição e concentrações variáveis (Steenackers et al., 2015; Zanolli & Zavatti, 2008).

O Brasil importou em torno de 99,54% do lúpulo utilizado em 2021. Segundo dados de Exportação e Importação Geral (BRASIL, 2022), no ano citado o país comprou uma quantidade aproximada de 4,7 mil toneladas de lúpulo. De acordo com um levantamento da Associação Brasileira dos Produtores de Lúpulo (Aprolúpulo, 2021), o país produziu de 35 a 40 hectares em 2021, sendo correspondente a aproximadamente 24 toneladas (Cerqueira, 2022) de um total mundial de 130.803 toneladas (Georgensgmueund, 2022). No entanto, essa produção está em constante expansão de produtividade e qualidade.

Diante do potencial dessa cultura, aliado a escassez de estudos acerca das variedades cultivadas no país, faz-se necessária a investigação das propriedades dessa planta. Dessa forma, o objetivo da pesquisa foi avaliar as atividades antimicrobiana e antiadesão de extratos hidroetanólicos de lúpulo (*Humulus lupulus L.*) das cultivares Comet, Polaris e Brewers Gold, produzidas no Brasil.

2 Material e Métodos

2.1 Material vegetal

Cones de lúpulo das variedades Comet, Polaris e Brewers Gold, cultivados no município de Petrópolis, Rio de Janeiro, Brasil (22°30'11.1"S 43°10'20.9"W) foram utilizados. As amostras passaram por processo de secagem a frio até alcançar 10% de umidade, embaladas e armazenadas a -12°C até o momento de obtenção dos extratos.

2.2 Preparo dos extratos

Os cones de lúpulo foram macerados com auxílio de graal e pistilo. Cada 500 mg do macerado obtido foi homogeneizado com 25 mL de etanol 96% (v/v). A extração foi realizada em banho maria a 60°C por 24h. Após resfriamento à temperatura ambiente, o extrato foi centrifugado a 2470 x g por 15 minutos (Z326K, Hermle, Alemanha). O sobrenadante obtido foi armazenado a -28°C até o momento de realização das análises (Abram et al., 2015).

2.3 Determinação de α e β -ácidos

Amostras dos extratos foram filtradas em membrana de 0,22 μ m. O teor de α e β -ácidos presentes nos extratos hidroetanólicos de lúpulo foi determinado por meio de análise cromatográfica utilizando *Ultra Performance Liquid Chromatography* (uPLC) equipado com sistema de bombas quaternárias e detector DAD (Waters ACQUITY H-Class PLUS, Waters Corporation, EUA). Uma coluna de fase reversa C18 (50 mm x 2,1 mm, 1,7 μ m) (Waters Corporation, Irlanda) foi utilizada. Os eluentes usados como fase móvel foram: A- solução de ácido acético e água (1:39, v/v), e fase móvel B - acetonitrila com o seguinte perfil de gradiente: 0 a 20 min, 100% a 0% A em B; 20 a 27 min, 100% B, com fluxo de 0,2 mL.min⁻¹ a 30 °C. O volume de injeção foi de 3 μ L, e o comprimento de onda de detecção foi 320 nm.

Como padrão externo para quantificação dos compostos foi utilizada uma mistura de α -ácidos e β -ácidos (Versuchsstation Schweizerische Brauereien, Zúrique, Suíça) de composição conhecida ICE-3 (Extrato de Calibração Internacional) composta por 13,88% cohumulona, 30,76% N+adhumulona, 13,44% colupulona, 10,84% N+adlupulona.

Uma curva de calibração de diferentes concentrações (0,075 – 9,6 mg.mL⁻¹) versus área de pico em sete pontos foi construída para cada um dos quatro representantes de α e β ácidos presentes no padrão ICE-3: 2.000.000x + 393979 para cohumulona, com R²=0,9974;

4.000.000x + 233313 para humulona+adhumulona, com $R^2=0,9994$; 5.000.000x + 314986 para colupulona, com $R^2=0,9955$; 1.000.000x + 175322 para lupulona+adlupulona, com $R^2=0,9951$.

2.4 Determinação da atividade antimicrobiana

2.4.1 Estirpes bacterianas e condições de crescimento

L. monocytogenes (ATCC 7644), *S. aureus* (ATCC 6538), *E. coli* (ATCC 25922), *S. Typhimurium* (ATCC 14028) e *P. aeruginosa* (ATCC 27853) estavam preservadas em ultrafreezer a -80°C no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, Brasil. As cepas foram ativadas duas vezes em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) (Himedia, Mumbai, Índia) e posteriormente estriadas em ágar BHI (Himedia, Mumbai, Índia). O caldo e o ágar foram incubados à 35°C por 24h.

2.4.2 Teste do halo de inibição

A sensibilidade bacteriana foi determinada por meio do método de difusão em ágar por cavidade em placa, segundo a metodologia proposta por Deans e Ritchie (1987). Com o auxílio de um swab, suspensões bacterianas de turbidez equivalente ao padrão McFarland 0,5, que corresponde a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, foram inoculadas em placas com ágar Müller-Hinton (Sigma-Aldrich, Índia). Orifícios de 6 mm de diâmetro foram feitos no ágar, em que 10 μL de cada extrato foi adicionado.

Os antibióticos ampicilina e tetraciclina foram utilizados como controle positivo, e etanol 96% (v/v) como controle negativo. As placas foram incubadas a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24h, e a zona de inibição dos extratos foi medida em mm.

2.4.3 Concentração Mínima Inibitória (CMI)

As Concentrações Mínimas Inibitórias (CMI's) dos extratos das três variedades estudadas foram determinadas para cada microrganismo conforme metodologia descrita por Wiegand, Hilpert & Hancock (2008), por meio de ensaio de diluição em caldo, em microplacas de 96 poços.

Diluições de extrato de lúpulo com caldo BHI foram preparadas em tubos de ensaio a fim de obter concentrações finais de 50, 20, 12,5, 5, 2 e 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ nos poços da microplaca. Em cada poço foram adicionadas alíquotas de 100 μL dessas diluições.

No preparo das suspensões bacterianas, para atingir turbidez equivalente ao padrão MacFarland 0,5, colônias de cada bactéria foram suspensas em solução salina 0,85% (m/v), seguidas de duas diluições decimais a fim de atingir concentração aproximada de $1,5 \times 10^6$ UFC.mL⁻¹. Alíquotas de 100 µL dessas suspensões também foram adicionados aos poços, resultando numa concentração final do inóculo de, aproximadamente $7,5 \times 10^5$ UFC.mL⁻¹.

Poços adicionados de 100 µL BHI + 100 µL do inóculo bacteriano foram utilizados como controle positivo de crescimento. As microplacas foram incubadas a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 h. A CMI foi definida como a menor concentração de extrato capaz de evitar crescimento bacteriano visível nos poços.

2.5 Inibição da adesão bacteriana

A atividade antiadesão dos extratos foi baseada no ensaio de coloração com cristal violeta em microplacas de 96 poços, descrito por Pejčić et al. (2020).

A suspensão celular, de cada bactéria, equivalente ao padrão McFarland 0,5 foi duplamente diluída para atingir uma concentração de 10^6 UFC.mL⁻¹ e uma alíquota de 100 µL foi adicionada aos poços de uma microplaca. Diluições de extrato de lúpulo com concentrações sub-CMI de 1 mg.mL^{-1} , $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$ foram preparadas, e 100 µL também foram adicionados aos poços. As placas inoculadas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 horas para adesão. Poços contendo 100 µL de caldo nutriente (Himedia, Mumbai, Índia) e 100 µL de inóculo bacteriano foram utilizados como controle positivo de crescimento. Poços adicionados de 100 µL de extrato de lúpulo nas concentrações testadas e 100 µL de solução salina 0,85% (m/v) foram utilizados como branco.

Após o período de incubação, os poços foram aspirados com pipetador, lavados duas vezes com solução salina esterilizada 0,85%, objetivando a remoção de células planctônicas, e secos em estufa a 60°C por, aproximadamente, 45 minutos. Em seguida, foram corados com 200 uL de uma solução de cristal violeta 0,5% (m/v) por 20 minutos, lavados com água destilada esterilizada e adicionados de 250 uL de etanol 96% (v/v) por 45 minutos para descoloração. A absorvância das soluções foi medida a 595 nm em espectrofotômetro de microplaca (Multiskan GO, Thermo Scientific, Finlândia).

Os valores obtidos foram expressos em porcentagem utilizando a equação abaixo. O controle positivo de crescimento foi considerado como 100% de formação de biofilme.

$$\text{Adesão bacteriana (\%)} = \frac{(\text{Abs Tratamento} - \text{Abs Branco})}{\text{Abs Controle de crescimento}} * 100$$

2.6 Curva de crescimento

Considerando que, dentre os microrganismos avaliados, os menores valores da CMI e os maiores diâmetros dos halos de inibição foram encontrados para *L. monocytogenes* e *S. aureus*, as demais análises foram realizadas com tais bactérias.

A curva de crescimento foi determinada na presença de diferentes concentrações subinibitórias de extratos de lúpulo (1 mg.mL⁻¹, 0,5 mg.mL⁻¹ e 0,25 mg.mL⁻¹), de acordo com a metodologia proposta por Bansal et al. (2021). Em cada poço da microplaca, foram adicionados 100 µL da suspensão celular diluída com concentração de 10⁶ UFC.mL⁻¹ e 100 µL das diluições dos extratos. A placa foi incubada a 35 ± 2°C e teve a absorbância medida a 600 nm em espectrofotômetro de microplaca em diferentes intervalos de incubação até estabilização da leitura, indicando ter chegado na fase estacionária (0, 0,5, 1, 2, 3, 4, 8, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 72, 96, 120 e 144 horas).

2.7 Efeito do extrato de lúpulo na produção de EPS

Para produção de biofilme por *S. aureus* e *L. monocytogenes* 100 µL de suspensão bacteriana correspondente a uma concentração de 10⁸ UFC.mL⁻¹ foram adicionados a 10 mL de caldo nutriente em tubos de ensaio separados com diferentes concentrações sub-CMI de extrato de lúpulo e incubados a 35 ± 2°C por 144 h em condição estática.

Para extração e quantificação de EPS, o método proposto por Liu et al. (2022) com modificações foi utilizado. Culturas tratadas e não tratadas foram centrifugadas a 10.000 x g durante 15 min, à 24 °C. O sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuspenso em 2 mL de solução salina 0,85%, agitado em vórtex por 2 minutos e submetido à banho-maria de 80°C por 30 minutos. Foi novamente agitado em vórtex e centrifugado a 10.000 x g por 20 minutos, à 24 °C.

O sobrenadante obtido foi submetido ao método fenol-sulfúrico proposto por Dubois et al. (1956) para quantificação de carboidratos. A princípio as amostras foram diluídas na proporção 1:9 e uma alíquota de 200 µL foi transferida para tubos de ensaio. A mesma quantidade de uma solução de fenol 5% (m/v) foi adicionada ao tubo e levemente agitada. Então 1 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 98% foi acrescentado e a solução foi homogeneizada

levemente. A solução permaneceu em temperatura ambiente por 15 minutos para o seu resfriamento e teve a absorbância medida a 490 nm. Para representação do teor de carboidratos presentes nas amostras, uma curva padrão de glicose foi preparada (0 – 200 mg.mL⁻¹). Os resultados foram expressos em µg/mL.

2.8 Alterações estruturais nos biofilmes

Para visualização da arquitetura dos biofilmes de *S. aureus* e *L. monocytogenes*, imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foram obtidas. Para isso foram utilizados cupons com medidas aproximadas de 1 cm x 1 cm, confeccionados em aço inoxidável 304, com grau de polimento 4. Aço inox com tais características são os mais utilizadas para fabricação de utensílios e superfícies indústria de alimentos (Andrade, 2008). Os cupons foram colocados em uma placa de 6 poços, juntamente com as diluições de extrato de lúpulo em caldo nutriente e a suspensão bacteriana, obtendo uma concentração final de 10⁵ UFC.mL⁻¹ em cada poço. As placas foram incubadas a 35 ± 2°C por 144 h. Como controle de crescimento, um dos poços foi inoculado sem a presença de extrato.

Após incubação, o preparo das amostras para visualização foi realizado segundo Liu et al. (2017). Para eliminação de células planctônicas, cada cupom foi lavado três vezes com tampão fosfato esterilizado (pH 7,2). Para fixação das células aderidas, foi utilizado glutaraldeído 2,5% (v/v) por 4 horas a 4°C. As amostras foram novamente lavadas em tampão fosfato esterilizado e desidratadas com concentrações crescentes de etanol (v/v) de 50%, 70%, 85%, 90%, 95% e 100% por 10 minutos cada, e uma etapa com 100% etanol por 20 minutos. Por fim, para secagem, foram levadas ao dessecador por 36h.

As amostras desidratadas foram levadas ao Departamento de Ciências Florestais e da Madeira, da UFES, revestidas com ouro por um pulverizador de íons (Q150R ES Plus, Quorum, Reino Unido), e observadas em microscópio eletrônico de varredura (JSM-IT200, Jeol, Japão) a 10 kV e ampliações variando de 500 a 8.000 vezes.

2.9 Análise Estatística

O experimento foi conduzido sob delineamento inteiramente casualizado. Os ensaios foram realizados em duplicata e três repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância ($p \leq 0,05$) e teste de Tukey, por meio do software XL Stat® (versão 2021.1.1.1085, Addinsoft). Para o tratamento dos dados experimentais obtidos no ensaio de curva de

crescimento, o suplemento DM Fit foi utilizado (Baranyi & Roberts, 1994). Todas as amostras tratadas foram comparadas com o controle.

3 Resultados

3.1 Determinação de α e β -ácidos

A cultivar Comet apresentou teor de α -ácidos superior às demais ($p \leq 0,05$) (Tabela 1). O conteúdo total de resinas moles foi de 1,60%, 1,22% e 1,17% para Comet, Polaris e Brewers Gold, respectivamente. Os cromatogramas obtidos para cada variedade podem ser consultados no Apêndice A.

Tabela 1. Teores de α -ácidos e β -ácidos das cultivares de lúpulo (média \pm desvio padrão).

Variedade	α -ácidos (%)			β -ácidos (%)		
	Cohumulona	Humulona + Adhumulona	Total	Colupulona	Lupulona + Adlupulona	Total
Comet	0.707 \pm 0.004 a	0.364 \pm 0.007 a	1.071	0.304 \pm 0.002 a	0.225 \pm 0.002 a	0.529
Polaris	0.345 \pm 0.008 b	0.236 \pm 0.002 b	0.581	0.290 \pm 0.001 b	0.350 \pm 0.003 b	0.640
Brewers Gold	0.202 \pm 0.001 c	0.187 \pm 0.005 c	0.389	0.290 \pm 0.003 b	0.494 \pm 0.006 c	0.784

Médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

3.2 Teste do halo de inibição

O método de difusão com cavidade em ágar é amplamente utilizado para validar a sensibilidade bacteriana à agentes antimicrobianos (Dušek et al., 2016). Neste estudo, as bactérias Gram-negativas apresentaram resistência aos extratos das variedades de lúpulo testadas (Tabela 2). Além disso, *P. aeruginosa* demonstrou resistência a ampicilina, um dos antibióticos utilizados como controle.

Tabela 2. Diâmetros das zonas de inibição, em mm, dos extratos de três variedades de lúpulo frente a cinco bactérias patogênicas (média \pm desvio padrão) obtidas pelo teste do halo de inibição.

Variedade	Bactérias				
	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Comet	24.00 \pm 2.00 a	21.33 \pm 1.26 c	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
Polaris	23.33 \pm 4.54 a	23.17 \pm 2.08 c	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
Brewers Gold	24.33 \pm 4.75 a	24.33 \pm 1.26 c	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
Ampicilina	26.17 \pm 2.75 a	38.67 \pm 0.29 a	18.17 \pm 0.58 b	25.00 \pm 0.50 a	0.00 \pm 0.00
Tetraciclina	28.67 \pm 1.04 a	29.83 \pm 0.29 b	31.00 \pm 1.80 a	24.67 \pm 0.29 b	13.17 \pm 0.76 a

Pares de médias seguidos por letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Os extratos de lúpulo inibiram as bactérias Gram-positivas, com halo variando de 21 a 24 mm. Referente a *S. aureus*, a inibição foi estatisticamente igual para as três cultivares avaliadas. Quando comparado aos antibióticos, os extratos revelaram atividade inferior ($p \leq 0,05$). Brewers Gold, por exemplo, exibiu o equivalente a 62,9% e 81,6% da ação da ampicilina e tetraciclina, respectivamente. Já para *L. monocytogenes*, a atividade antimicrobiana entre os três extratos foi estatisticamente igual, e demonstraram a mesma eficiência comparada aos antibióticos testados ($p > 0,05$).

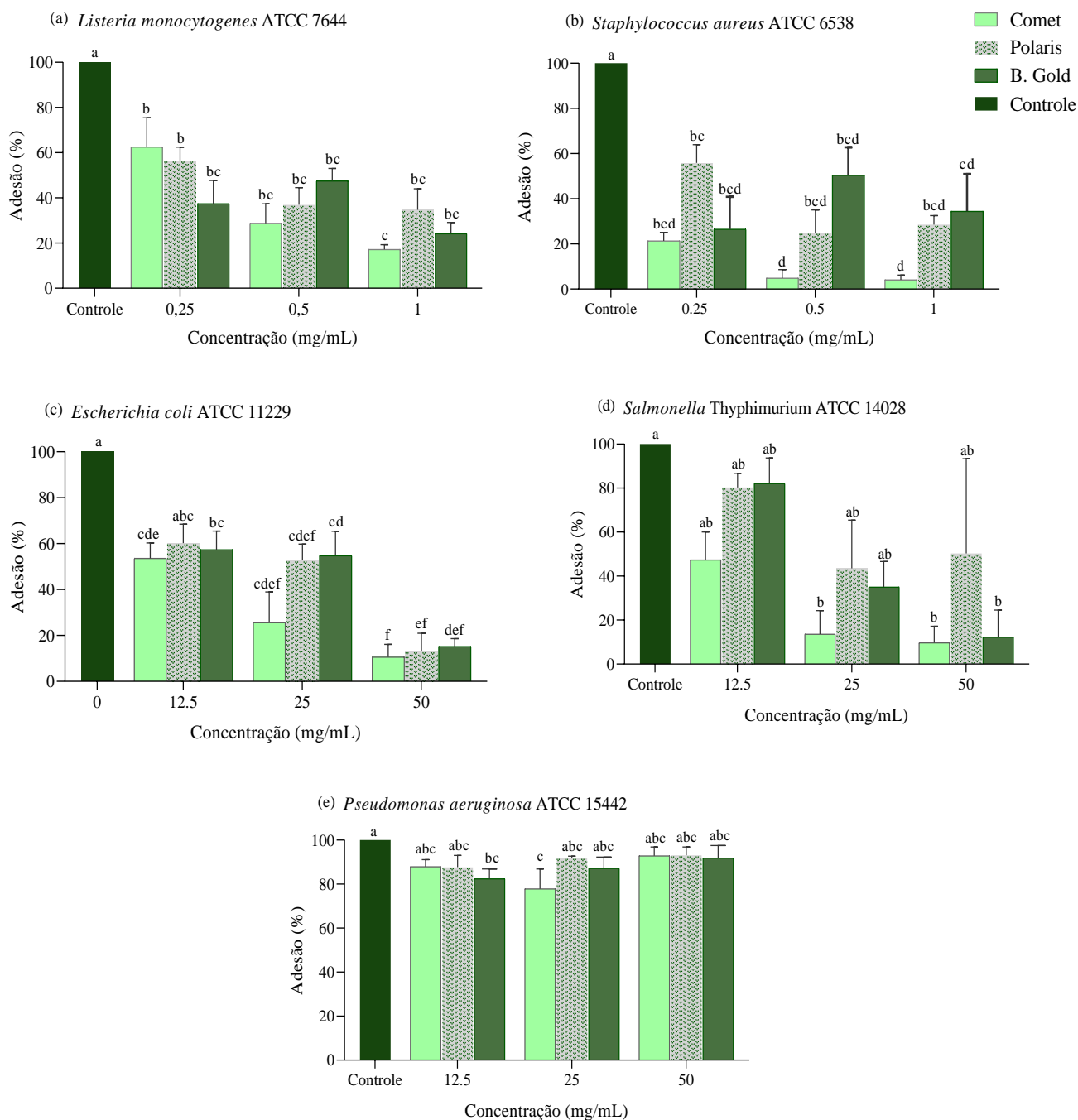
3.3 Concentração Mínima Inibitória (CMI)

Os extratos de lúpulo apresentaram atividade inibitória frente as bactérias Gram-positivas avaliadas, *S. aureus* e *L. monocytogenes*, com valor da CMI de 2 mg.mL^{-1} . As demais cepas bacterianas apresentaram maior resistência aos extratos, com médias de CMI maiores que a maior concentração testada, 50 mg.mL^{-1} . Uma correlação entre estes resultados e o teste do halo pode ser notada, uma vez que menores valores de CMI corresponderam a presença de zona de inibição de crescimento.

3.4 Inibição da adesão bacteriana

Os extratos de lúpulo das cultivares estudadas demonstraram ação significativa na adesão das bactérias avaliadas (Figura 1). Destaca-se o extrato da cultivar Comet que ocasionou redução na adesão de todos os microrganismos avaliados ($p \leq 0,05$) em relação ao controle. Entre as bactérias avaliadas, *Pseudomonas aeruginosa* demonstrou maior porcentagem de adesão diante das concentrações testadas. As três variedades de lúpulo reduziram a adesão das bactérias patogênicas em relação ao controle, exceto para *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa* em algumas concentrações. Na adesão de *S. Typhimurium* as concentrações de 25 mg.mL^{-1} de Comet e 50 mg.mL^{-1} de Comet e Brewers Gold diferiram do controle. Enquanto a adesão de *P. aeruginosa* foi menor apenas para o extrato de Comet na concentração de 25 mg.mL^{-1} .

Figura 1. Adesão de (a) *L. monocytogenes* ATCC 7644; (b) *S. aureus* ATCC 6538; (c) *E. coli* ATCC 11229; (d) *S. Typhimurium* ATCC 14028 e (e) *P. aeruginosa* ATCC 15442, em %, submetidas a diferentes concentrações subinibitórias de extratos de lúpulo das variedades Comet, Polaris e Brewers Gold.



Médias seguidas por letras diferentes, no mesmo gráfico, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Referente às bactérias *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *E. coli*, nota-se que as concentrações testadas dos três extratos avaliados resultaram em percentual de adesão

significativamente diferente do controle sem extrato ($p < 0,05$). Houve expressiva redução na % de adesão de *S. aureus*, nas concentrações de $0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$, $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$, 1 mg.mL^{-1} da cultivar Comet, em que a adesão das células foi de somente 21,35%, 4,88% e 4,16%, respectivamente. Já a adesão de *S. Typhimurium* foi reduzida para 47,33, 13,65% e 9,66% quando foram usadas concentrações de $12,5 \text{ mg.mL}^{-1}$, 25 mg.mL^{-1} e 50 mg.mL^{-1} dessa mesma cultivar. A respeito da variedade Polaris, o destaque foi para a porcentagem de adesão de 13,15% referente a *E. coli* mediante aplicação de 50 mg.mL^{-1} do extrato. As bactérias *S. Typhimurium* e *E. coli* tiveram a adesão reduzida para 12,28% e 15,22% com a presença de 50 mg.mL^{-1} do extrato da variedade Brewers Gold. Para realização desse ensaio, a concentração de 50 mg.mL^{-1} de extrato de lúpulo foi considerada subinibitória para as bactérias Gram-negativas. Os valores das leituras de densidade ótica ($\text{DO}_{595\text{nm}}$) e as porcentagens médias de adesão estão no Apêndice B.

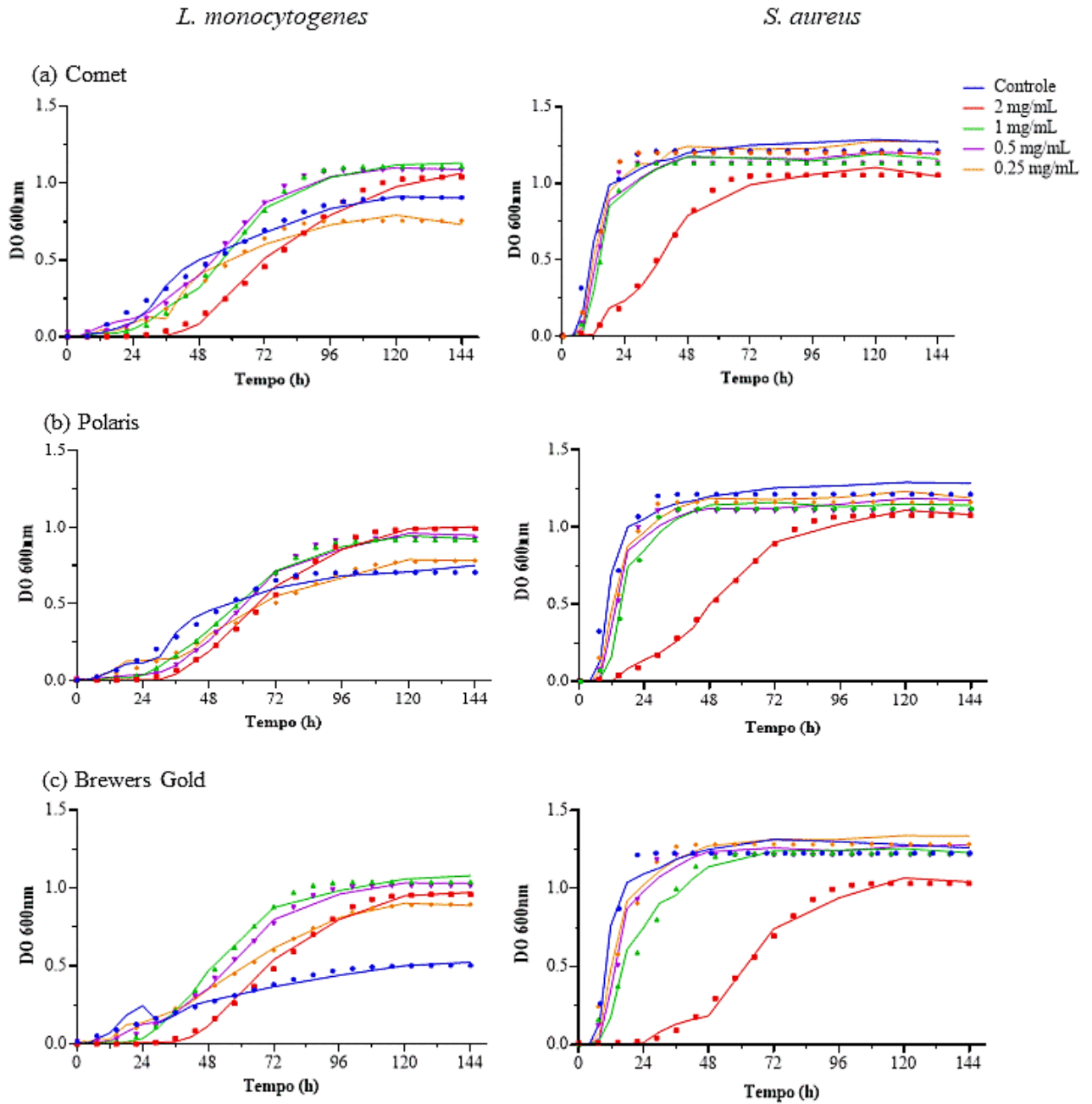
3.5 Curva de crescimento

Métodos como a turbidimetria são amplamente utilizados para obter parâmetros de crescimento. As medições de absorvância são relativamente mais simples e rápidas quando comparadas aos métodos de contagem de células viáveis, além de poderem ser automatizadas (Mytilinaios et al., 2012).

As curvas de crescimento de *L. monocytogenes* e *S. aureus* apresentaram comportamentos distintos na presença das diferentes concentrações dos extratos (Figura 2).

Comparado a *S. aureus*, *L. monocytogenes* apresentou uma fase de adaptação maior (lag), seguida de um aumento gradual de densidade celular (fase log) até atingir um nível populacional máximo na fase estacionária. As etapas do crescimento de *S. aureus* foram diferentes, com fase lag de menor duração e fase exponencial mais acentuada, refletindo em menor tempo para atingir a fase estacionária.

Figura 2. Curvas de crescimento de *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *S. aureus* ATCC 6538 na presença de diferentes concentrações de extratos de lúpulo das variedades (a) Comet, (b) Polaris e (c) Brewers Gold.



* As linhas correspondem às leituras de densidade ótica (DO_{600nm}) realizadas durante o ensaio. As formas geométricas representam os dados preditivos gerados pelo software DM Fit.

Os dados de absorvância foram utilizados para construção de uma curva de crescimento a fim de obter-se a duração da fase lag, taxa máxima de crescimento (μ máx) e densidade de células na fase estacionária (DCF_E) das bactérias avaliadas (Tabela 3).

Tabela 3. Duração da fase lag (lag), taxa máxima de crescimento (μ máx) e densidade de células na fase estacionária (DCFE) de *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *S. aureus* ATCC 6538 na presença de diferentes concentrações de extratos de lúpulos (média \pm desvio padrão).

Variedade	Concentração de extrato de lúpulo(mg.mL ⁻¹)	<i>L. monocytogenes</i>			<i>S. aureus</i>		
		Lag (h)	μ máx (DO/h)	DCFE (DO)	Lag (h)	μ máx (DO/h)	DCFE (DO)
Comet	0	4.9 \pm 5.941 de	0.012 \pm 0.004 a	0.905 \pm 0.102 ab	3.4 \pm 3.01 cd	0.068 \pm 0.017 abcd	1.202 \pm 0.047 ab
	0.25	25.2 \pm 11.642 abcde	0.021 \pm 0.015 a	0.751 \pm 0.046 abc	6.0 \pm 1.394 cd	0.083 \pm 0.018 a	1.201 \pm 0.094 ab
	0.5	23.5 \pm 6.984 abcde	0.017 \pm 0.002 a	1.089 \pm 0.014 ab	7.6 \pm 0.559 cd	0.090 \pm 0.003 a	1.115 \pm 0.029 ab
	1	30.6 \pm 1.123 abcd	0.019 \pm 0.002 a	1.112 \pm 0.031 a	5.9 \pm 5.166 cd	0.077 \pm 0.034 ab	1.138 \pm 0.037 ab
	2	42.6 \pm 5.232 a	0.016 \pm 0.002 a	1.048 \pm 0.02 ab	15.5 \pm 8.773 bc	0.025 \pm 0.007 cd	1.060 \pm 0.061 b
Polaris	0	9.8 \pm 14.844 cde	0.013 \pm 0.008 a	0.729 \pm 0.059 bc	3.7 \pm 3.258 cd	0.075 \pm 0.022 abc	1.205 \pm 0.05 ab
	0.25	16.3 \pm 8.772 bcde	0.010 \pm 0.002 a	0.787 \pm 0.087 abc	3.7 \pm 3.38 cd	0.063 \pm 0.017 abcd	1.161 \pm 0.05 ab
	0.5	34.9 \pm 6.001 abc	0.019 \pm 0.002 a	0.926 \pm 0.042 ab	4.0 \pm 3.595 cd	0.067 \pm 0.022 abcd	1.114 \pm 0.063 ab
	1	28.1 \pm 1.646 abcde	0.016 \pm 0.003 a	0.918 \pm 0.037 ab	4.3 \pm 3.742 cd	0.053 \pm 0.016 abcd	1.124 \pm 0.024 ab
	2	34.7 \pm 8.772 abc	0.016 \pm 0.002 a	0.991 \pm 0.031 ab	23.8 \pm 9.406 b	0.019 \pm 0.002 d	1.072 \pm 0.074 b
Brewers Gold	0	0 \pm 0	0.007 \pm 0.002 a	0.375 \pm 0.53 c	5.5 \pm 0.356 cd	0.094 \pm 0.007 a	1.224 \pm 0.037 ab
	0.25	17.5 \pm 15.278 abcde	0.012 \pm 0.002 a	0.894 \pm 0.141 ab	1.9 \pm 3.245 cd	0.055 \pm 0.02 abcd	1.280 \pm 0.006 a
	0.5	26.2 \pm 13.195 abcde	0.017 \pm 0.002 a	1.016 \pm 0.073 ab	4.2 \pm 3.691 cd	0.061 \pm 0.024 abcd	1.227 \pm 0.03 ab
	1	26.3 \pm 3.566 abcde	0.020 \pm 0.002 a	1.040 \pm 0.061 ab	0 \pm 0	0.030 \pm 0.003 bcd	1.225 \pm 0.036 ab
	2	41.3 \pm 4.129 ab	0.016 \pm 0.000 a	0.960 \pm 0.145 ab	37.0 \pm 7.003 a	0.021 \pm 0.009 d	1.059 \pm 0.116 b

Médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Um aumento da fase lag de *L. monocytogenes* foi observado na presença dos extratos de Comet e Brewers Gold, quando aplicados na CMI (2 mg.mL^{-1}), aumentando significativamente a duração dessa fase em 37,7 h e 41,3 h respectivamente.

Os extratos de Polaris e Brewers Gold adicionados na concentração de 2 mg.mL^{-1} resultaram em aumento significativo ($p \leq 0,05$) do tempo de fase lag de *S. aureus*, demonstrando que na presença desses extratos as células demoraram mais para se adaptar e iniciarem a multiplicação (fase log).

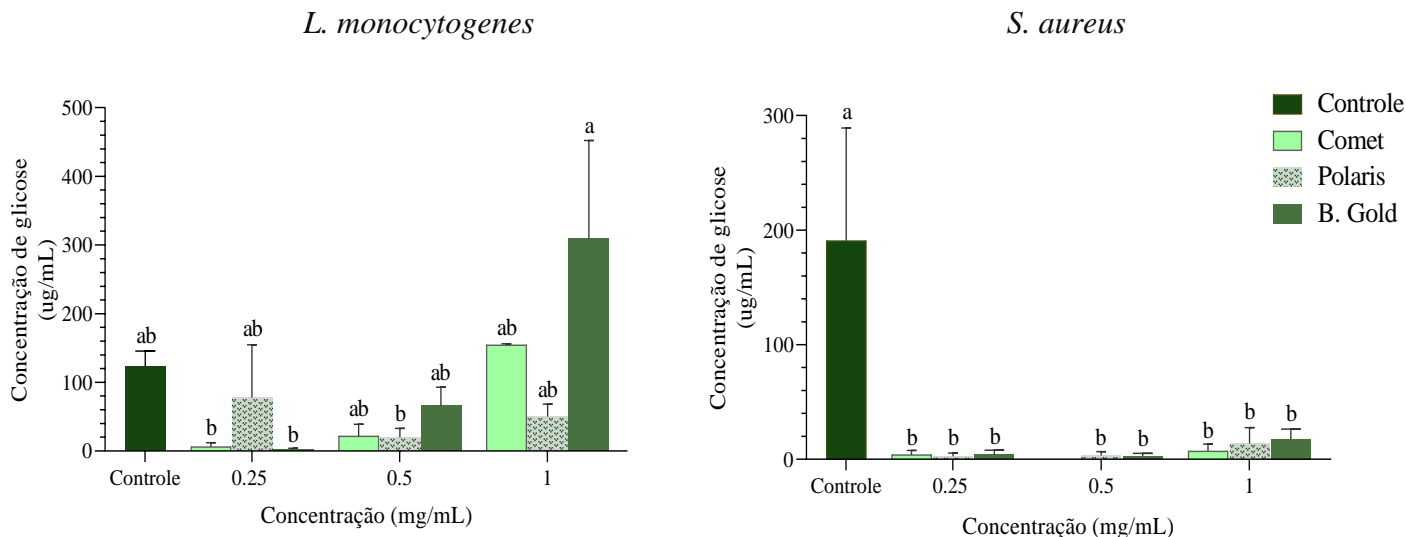
Quando na fase exponencial, após a fase de adaptação, a taxa máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) das células de *L. monocytogenes* foi igual para todos os tratamentos do mesmo extrato ($p > 0,05$). Na DCFE observa-se o mesmo comportamento, não houve diferença entre as concentrações testadas para as duas bactérias. Os extratos das variedades Polaris na concentração mínima inibitória (2 mg.mL^{-1}) e Brewers Gold nas concentrações de 1 e 2 mg.mL^{-1} demonstraram exercer influência na redução da velocidade de multiplicação celular ($\mu_{\text{máx}}$) de *S. aureus*.

3.6 Efeito do extrato de lúpulo na produção de EPS

A matriz de EPS é composta majoritariamente por compostos polissacarídicos. Além de colaborar para manutenção e resistência de biofilmes já formados, a matriz EPS possibilita a adesão de bactérias em diversas superfícies (Flemming et al., 2016), sendo um componente fundamental para formação de biofilmes.

L. monocytogenes e *S. aureus* produziram diferentes quantidades de EPS, representada neste estudo pela quantificação de glicose presente nos biofilmes (Figura 3). As concentrações subinibitórias dos extratos de lúpulo das variedades testadas reduziram a produção de EPS por *S. aureus* ($p \leq 0,05$). Em relação a *Listeria monocytogenes*, nenhum extrato nas concentrações avaliadas reduziu a produção de EPS de forma significativa quando comparada ao controle.

Figura 3. Concentração de glicose ($\mu\text{g/mL}$) presente no EPS extraído de biofilmes de *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *S. aureus* ATCC 6538 submetidas a diferentes concentrações subinibitórias de extratos de lúpulo das variedades Comet, Polaris e Brewers Gold.



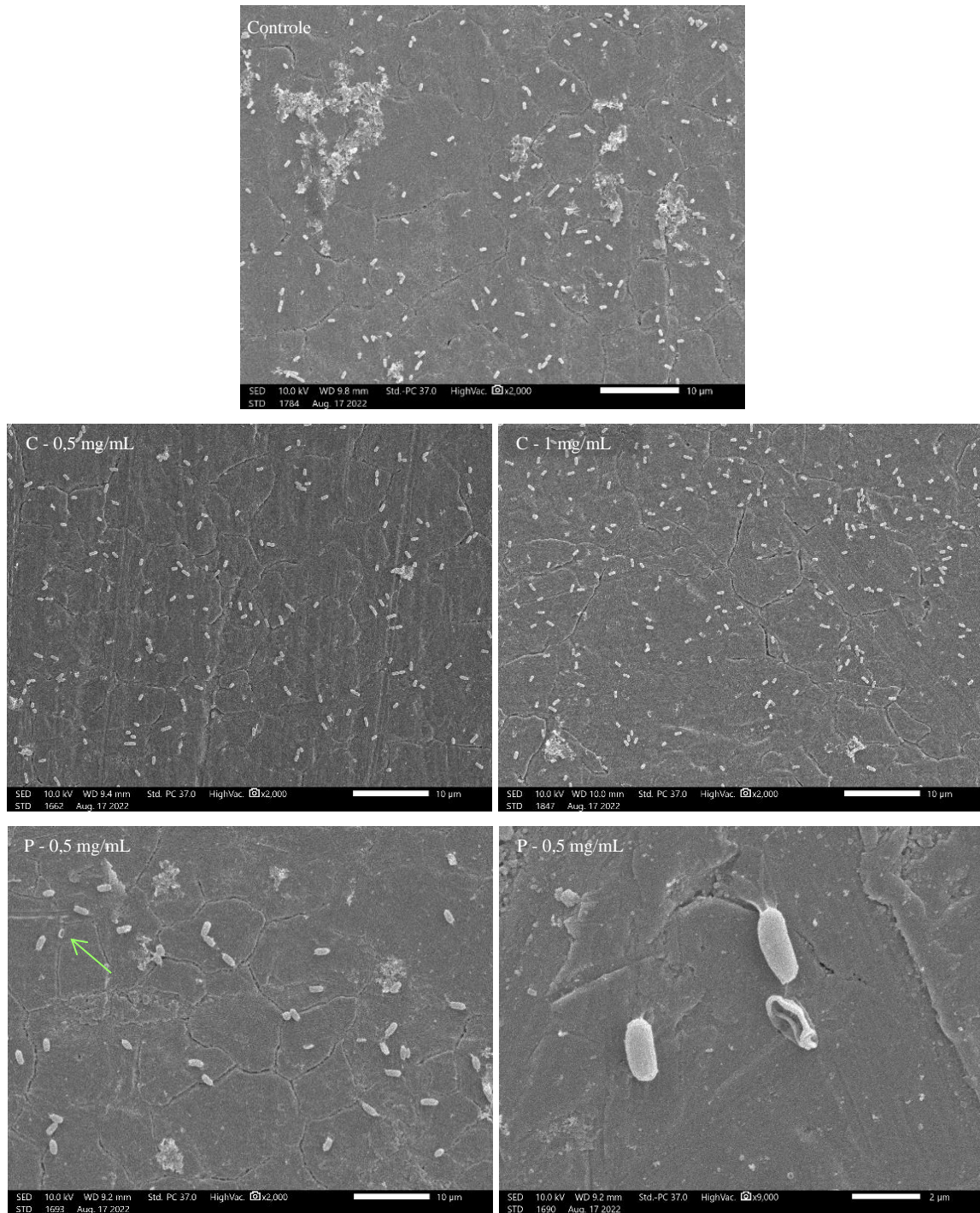
Médias seguidas por letras diferentes, no mesmo gráfico, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

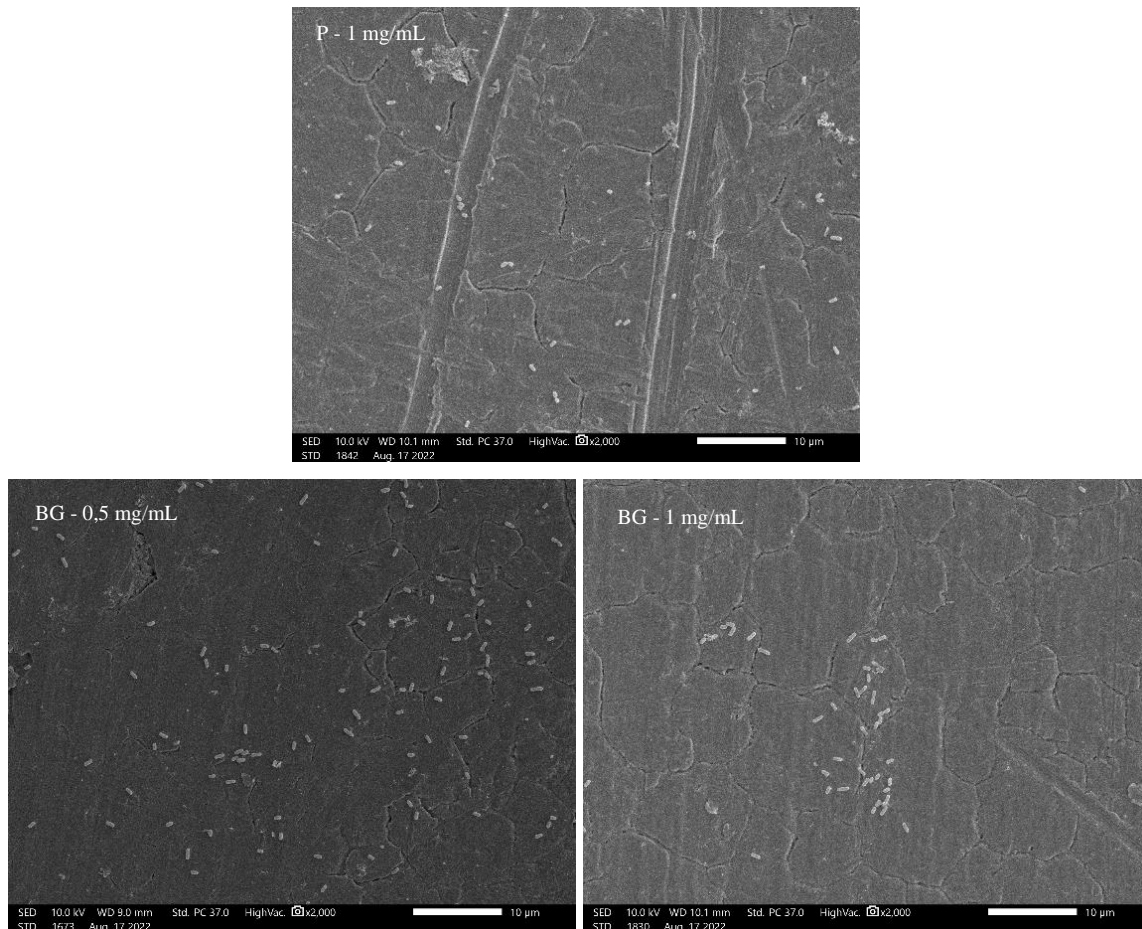
3.7 Alterações estruturais nos biofilmes

Após 144 horas de exposição a diferentes concentrações subinibitórias de extratos de lúpulo, células de *L. monocytogenes* e *S. aureus* aderidas aos cupons de aço inoxidável foram observadas sob Microscopia Eletrônica de Varredura. Foram escolhidas áreas representativas para o registro das micrografias.

As micrografias das células tratadas com os extratos de lúpulo mostraram redução na concentração das células de *L. monocytogenes*, principalmente na maior concentração aplicada de $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ das variedades Polaris e Brewers Gold (Figura 4). A concentração $0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de Polaris levou ao rompimento celular (seta). Quando comparada ao controle, nota-se que também uma redução do tamanho celular.

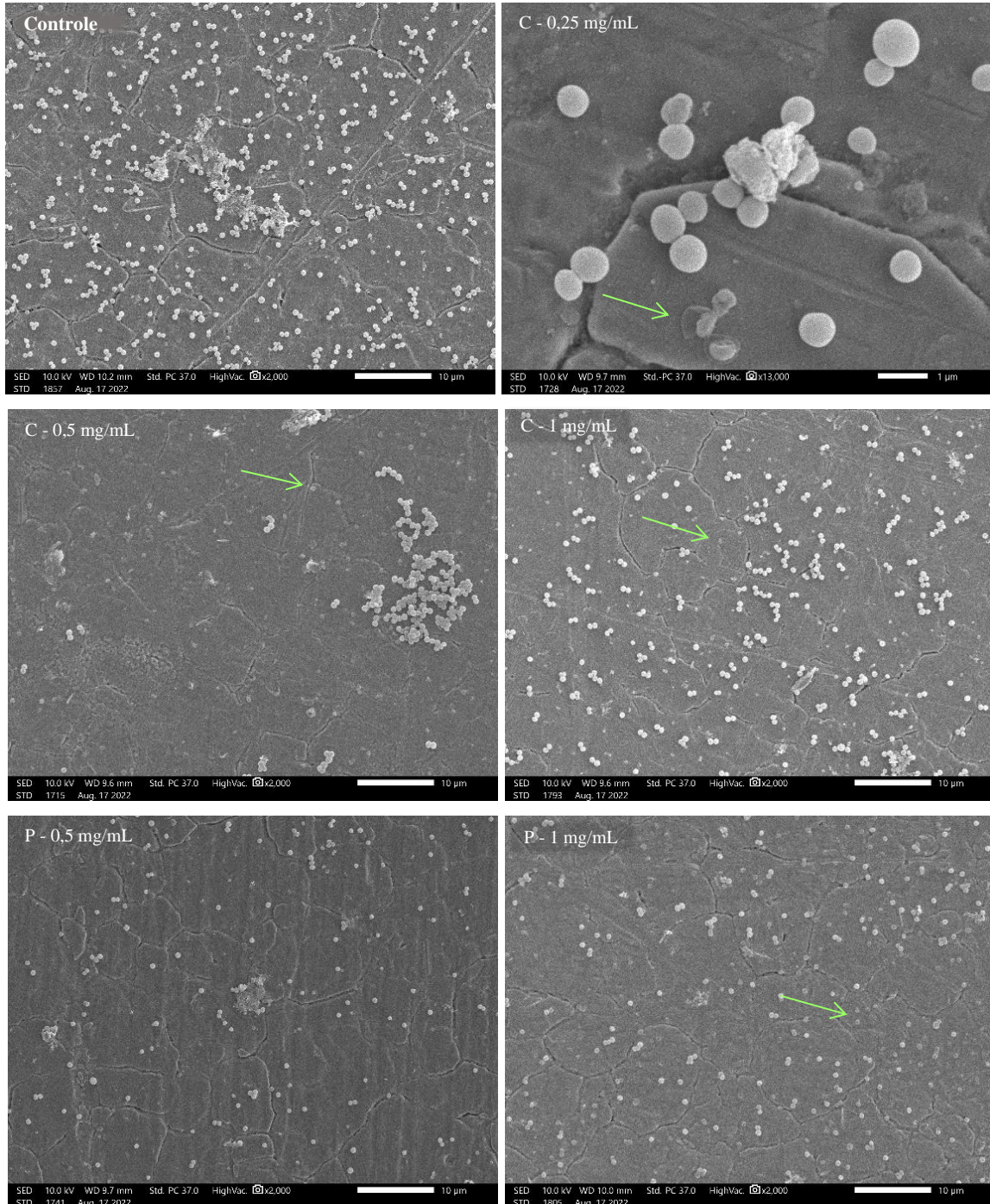
Figura 4. Micrografias de *Listeria monocytogenes* após 144h de incubação na ausência (Controle) e aplicação de extratos de lúpulo das variedades Comet (C), Polaris (P) e Brewers Gold (BG) em diferentes concentrações subinibitórias: 0,5 mg.mL⁻¹ e 1 mg.mL⁻¹.

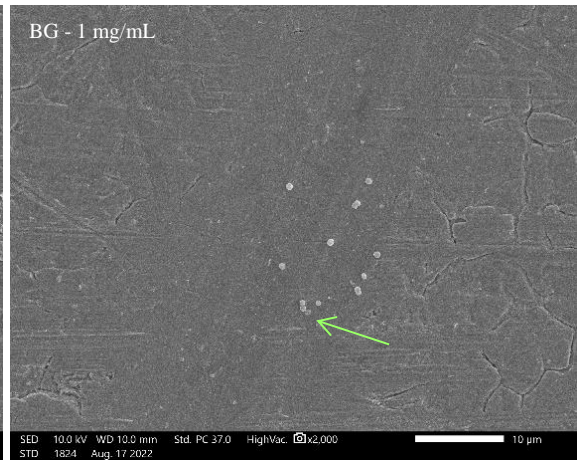
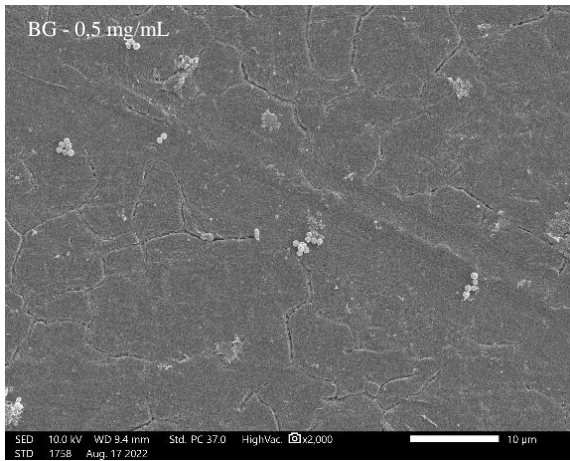




No tratamento controle de *S. aureus* as células apresentam morfologia típica (Figura 5). Por outro lado, nos tratamentos com os extratos de lúpulo, nota-se a presença de células deformadas e com bordas irregulares, sugerindo que a integridade da membrana celular também foi comprometida (setas), assim como na concentração 0,25 mg.mL⁻¹ de Comet. Observou-se uma redução no aglomerado de células em relação ao controle, e diminuição expressiva no número de células bacterianas aderidas especialmente na presença do extrato de Brewers Gold.

Figura 5. Micrografias de *S. aureus* após 144h de incubação na ausência (Controle) e aplicação de extratos de lúpulo das variedades Comet (C), Polaris (P) e Brewers Gold (BG) em diferentes concentrações subinibitórias: 0,5 mg.mL⁻¹ e 1 mg.mL⁻¹.





4 Discussão

A quantificação do conteúdo de ácidos amargos do lúpulo tem sido realizada desde sua descoberta. É um parâmetro básico para determinação de sua qualidade relacionada a fabricação de cerveja e à suas atividades antimicrobiana e antioxidante (Jurková et al., 2012).

Cohumulona, humulona e adhumulona são representantes dos α -ácidos, a maior porção de resinas moles presentes no lúpulo. Já os β -ácidos são os componentes mais associados com a atividade antibacteriana da planta. Com estruturas químicas semelhantes, seus nomes são análogos: colupulona, lupulona e adlupulona (Bamforth, 2000; Sanz et al., 2019; Steenackers et al., 2015).

Os valores de α -ácidos encontrados no presente estudo estão na faixa de 0,00% e 4,12% descrita por Rodolfi et al. (2022) referente a amostras de lúpulo silvestre italiano. Por outro lado, ao analisarem cones secos de outras variedades de lúpulo cultivadas no Brasil, Arruda et al. (2021) reportaram teores totais de resinas moles superiores entre 9,00% e 60,18%. Proporções de ácidos amargos presentes no lúpulo, bem como as concentrações dos representantes individuais estão fortemente ligadas à variedade, estágio de maturação, condições climáticas de cultivo e colheita, processamento, entre outros (Arruda et al., 2021; Sanz et al., 2019; van Cleemput et al., 2009). Além disso, esses compostos são muito sensíveis à oxidação e estão sujeitos a degradação ao longo do processamento e armazenamento.

Diversos estudos relatam que os beta ácidos possuem atividade antimicrobiana mais acentuada que os alfa ácidos (Bocquet et al., 2019; Kramer et al., 2015; van Cleemput et al., 2009). Por outro lado, o teor de α -ácidos pode ser relacionado ao teor de xantohumol, principal polifenol do lúpulo que também já foi considerado o composto mais ativo contra bactérias Gram-positivas (Hrnčič et al., 2019; Stompor & Zarowska, 2016).

No teste do halo de inibição, bactérias Gram-positivas foram mais sensíveis aos extratos de lúpulo do que as Gram-negativas. Tian et al. (2022) encontraram o mesmo resultado em um comparativo de halos de inibição entre *E. coli* e *S. aureus* considerando um filme de hidrogel à base de quitosana adicionado de lupulona, adhumulona e colupulona. Di Lodovico et al. (2020) relataram que o extrato de lúpulo exibiu atividade contra uma variedade de cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *Cutibacterium acnes*, com zonas de inibição variando entre 12 e 21 mm.

Bactérias Gram-positivas possuem uma camada mais espessa de peptidoglicano, porém podem ser mais vulneráveis à agentes antimicrobianos pois não possuem uma membrana externa, ao contrário das Gram-negativas. Supõe-se que a membrana externa das Gram-

negativas atua como uma barreira contra substâncias hidrofóbicas e, por isso inibe a difusão de agentes antimicrobianos do lúpulo (Leonida et al., 2018; Shimwell, 1937).

O mesmo comportamento foi notado na determinação da Concentração Mínima Inibitória. Avaliando um extrato bruto da variedade de lúpulo polonesa *Marynka*, Klimek et al. (2021) descreveram propriedades bactericidas contra todas as bactérias Gram-positivas testadas com valores de CMI entre 0,098 e 0,781 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

No entanto, ao examinar nove variedades cultivadas no Brasil, Arruda et al. (2021) relataram atividade antimicrobiana de extrato hidroetanólico de lúpulo contra as mesmas bactérias Gram-negativas testadas no presente trabalho. Porém, com valores de CMI menores em relação ao presente estudo, variando entre 0,38 mg.mL^{-1} para cultivar *Halertau Mittelfrüh* em *P. aeruginosa*, e 1,86 mg.mL^{-1} para cultivar Mantiqueira frente a *S. Typhimurium*. Um fator importante que descreve este efeito é a composição do extrato, ressaltando também a influência da cultivar e das condições de plantio sobre as propriedades antimicrobianas. Esse resultado corrobora com concentração total de ácidos amargos encontrados no presente estudo.

A atividade antibacteriana dos cones de lúpulo é frequentemente atribuída às propriedades hidrofóbicas das resinas presentes nessa planta, e já foi relatado que é aumentada quanto maior o grau de hidrofobicidade desses compostos (Bocquet et al., 2019; Gerhäuser, 2005; Schmalreck et al., 1974). As resinas macias interagem efetivamente com a parede celular bacteriana. Tal fato, associado a danos causados à integridade da membrana celular, configuram os principais mecanismos de ação antimicrobiana dos componentes do lúpulo (Rozalski et al., 2013). Teuber e Sehmalreck (1973) concluíram que a aplicação dessas resinas, representadas por diferentes α - e β -ácidos resultou no extravasamento da membrana celular de *Bacillus subtilis*.

Humulona e lupulona são considerados ácidos fracos. Suas formas não dissociadas são os principais compostos ativos presentes nos cones. Esses ácidos invadem a célula, se dissociam e atuam como ionóforo, causando efluxo de alguns cátions. O aumento da concentração de prótons, e conseqüente redução do pH intracelular, prejudicam a absorção e transporte ativo de nutrientes e influenciam nas reações enzimáticas essenciais, resultando na inativação celular de bactérias sensíveis ao lúpulo (Sakamoto & Konings, 2003).

Nas curvas de crescimento, pode-se perceber que a presença de extratos de lúpulo aumentou a fase lag no desenvolvimento dos microrganismos, provavelmente como uma resposta ao estresse da presença de um agente antimicrobiano. Nessa fase as bactérias começam a sintetizar proteínas e ácidos nucleicos necessários à divisão celular (Vogel et al., 2014). Seu

alongamento pode ser uma resposta à escassez de nutrientes, carbono ou excesso de fatores estressantes como diferentes faixas de pH, temperatura, sal, presença de agentes antimicrobianos e outros podem resultar nesse comportamento. Portanto, a fase lag permite a adaptação das células bacterianas, oferecendo uma vantagem de sobrevivência inicial para posterior multiplicação (Bansal et al., 2021; Beales, 2004; Bertrand, 2019; Prado Martin et al., 2013).

A fixação de células bacterianas em uma superfície pode ser influenciada por propriedades da superfície em que estão inseridos, da superfície celular e presença de apêndices como fímbrias e flagelos (Bansal et al., 2021). Porém, para isso, os microrganismos precisam superar uma barreira de energia potencial a fim de possibilitar contato direto com uma superfície. Essa aproximação é mediada por força de atração de van der Waals, e pode ser considerada reversível. Com a barreira de energia superada e maior proximidade entre as superfícies da bactéria e do material, interações mais específicas podem ocorrer. É possível que essa adesão seja irreversível. Resumidamente, a partir de então inicia-se a formação de microcolônias, que se desenvolvem até a formação da estrutura tridimensional de um biofilme, com todo mecanismo para sua sobrevivência (Andrade, 2008; Bridier et al., 2015; Galié et al., 2018). Quando em biofilme, os microrganismos são mais resistentes a antimicrobianos pois possuem a proteção da barreira composta por uma matriz de EPS. A última etapa do ciclo de vida de um biofilme é o desprendimento de células microbianas, que possibilita a formação de novas comunidades bacterianas e/ou contaminação de alimentos que passem por essa superfície (Abdallah et al., 2014). Dessa forma, a adesão é uma etapa crítica para formação dessas comunidades bacterianas, por isso evitá-la em superfícies do setor alimentício é fundamental para evitar o desenvolvimento de biofilmes, com consequente garantia da segurança dos alimentos.

Os extratos hidroetanólicos de lúpulo demonstraram interferir na adesão celular (Figura 1). A modulação da expressão de genes relacionados a síntese de biofilmes pode explicar esse comportamento conforme já descrito para outros agentes antimicrobianos (Bansal et al., 2021). Uma menor inibição da adesão foi observada para *Pseudomonas aeruginosa* que é um patógeno intrinsecamente resistente a diversas classes de antibióticos, além de possuir grande capacidade de formação de biofilme (El-Sayed et al., 2020). Já foi reportado que a permeabilidade da membrana dessa bactéria à antibióticos é de 12 a 100 vezes menor que a de *E. coli*, por exemplo (Hancock, 1998; Nikaido & Hancock, 1986). Seu genoma também é extenso, com alta proporção de proteínas relacionadas a funções de regulação de transporte e virulência, e muitos

dos seus genes estão envolvidos na codificação de proteínas relacionadas com resistência antimicrobiana (Kipnis et al., 2006; Mesaros et al., 2007). Sinergicamente ao influxo de substâncias, parte da resistência de *P. aeruginosa* também pode ser justificada por efluxo ativo. Os principais sistemas de efluxo dessa bactéria pertencem ao grupo Hidrofóbico/Anfifílico-1 (HAE1), que regula esse mecanismo junto com proteínas transmembrana (Poole & Srikumar, 2001). Hancock (1998) afirma que moléculas hidrofóbicas são capazes de permear a membrana externa desse patógeno, porém, em concentrações sub-CMI, podem ser imediatamente exportados.

Os extratos de lúpulo reduziram significativamente a produção de exopolissacarídeos por *S. aureus*. Gandhi et al., (2017) também relataram que a proporção de carboidratos encontrada no EPS produzido pela mesma bactéria foi menor nas amostras tratadas com extrato vegetal de *Sesbania grandiflora*. Intervenções que levem à redução de EPS ou à inibição de sua síntese são uma forma de controlar a formação de biofilmes bacterianos.

Microrganismos podem expressar comportamentos adaptativos resultantes da exposição a diferentes tipos de estresse. Células de *L. monocytogenes*, por exemplo, podem se agregar (Maggio et al., 2022) ou formar biofilmes mais facilmente (Wang et al., 2022) como mecanismo de proteção. Dessa forma, conseguem reduzir a superfície de contato com o meio exterior, onde está o agente estressante, fazendo com que as células internas sejam mais protegidas (Gianotti et al., 2008; Maggio et al., 2022). Porém, tal comportamento não foi observado nos resultados do presente trabalho, uma vez que os extratos nas concentrações avaliadas reduziram a porcentagem de adesão de *L. monocytogenes* e não foram observadas maiores agregações das células na microscopia. Por outro lado, não houve redução de produção de EPS, expresso em glicose, por essa bactéria em relação ao controle. A matriz EPS é composta de uma mistura complexa de água, açúcares, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. Entre os açúcares, podem estar presentes a glicose, manose, frutose, galactose, ramnose, entre outros (Andrade, 2008; Flemming et al., 2016; Yousef & Juneja, 2003). A metodologia utilizada para quantificação de EPS realizou a quantificação de glicose, constituindo uma limitação com possível interferência no resultado do total de EPS realmente produzido.

As imagens obtidas por MEV confirmaram que os extratos reduziram a adesão das bactérias avaliadas e causaram mudanças estruturais nas células bacterianas em resposta à exposição a concentrações subinibitórias. Uma variação morfológica nas células pode ser observada. Yousef e Juneja (2003) afirmam que a adaptação ao estresse pode ser mediada por

alterações desse tipo, incluindo alterações metabólicas e estruturais. A redução do número de células aglomeradas e aderidas também pode ser notada.

Microrganismos quando em condições fisiológicas normais possuem um comportamento ideal. Qualquer mudança nessas condições resulta em estresse para eles, que podem responder de forma adaptativa ou transitória, sobrevivendo a condições que seriam normalmente letais (Ray, 1986; Russell et al., 1995). Além disso, cada microrganismo pode possuir níveis de tolerância diferentes e mecanismos inerentes contra estresses específicos. Yousef e Juneja (2003) ainda acrescentam que a resposta adaptativa é mais visível em doses subletais, pois a bactéria ainda está em estado metabólico ativo.

A redução da adesão de *L. monocytogenes* e *S. aureus* em conjunto com a diminuição da produção de EPS por *S. aureus* e redução no número de células aderidas, comprovadas pela MEV, reforçam a atividade antiadesão dos extratos de lúpulo quando aplicados em concentrações subinibitórias.

5 Conclusões

As atividades antibacteriana e antibiofilme de extratos de variedades de lúpulo cultivadas no Brasil foi avaliada pela primeira vez. Apesar de ser uma cultura em processo de adaptação às condições climáticas do país, os resultados relatados mostraram efeitos notáveis sobre inibição e adesão das bactérias avaliadas. São resultados importantes que amparam a possibilidade de utilizar essa matéria prima, ou compostos isolados para formulação de sanitizantes a base de compostos naturais. Mais estudos sobre a composição dos extratos, influência na expressão de genes relacionados a resistência antimicrobiana e de formação de biofilme dariam grande suporte para melhor conhecimento acerca das variedades de lúpulo cultivadas no Brasil, visto o potencial de expansão dessa cultura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdallah, M., Benoliel, C., Drider, D., Dhulster, P., & Chihib, N. E. (2014). Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. Em *Archives of Microbiology* (Vol. 196, Número 7, p. 453–472). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00203-014-0983-1>
- Abram, V., Čeh, B., Vidmar, M., Hercezi, M., Lazić, N., Bucik, V., Možina, S. S., Košir, I. J., Kač, M., Demšar, L., & 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>
- Andrade, N. J. (2008). *Higiene na Indústria de Alimentos: Avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos*. Varela.
- Arruda, T. R., Pinheiro, P. F., Silva, P. I., & Bernardes, P. C. (2021). A new perspective of a well-recognized raw material: Phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities and α - and β -acids profile of Brazilian hop (*Humulus lupulus* L.) extracts. *LWT*, 141. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.110905>
- Bamforth, C. W. (2000). Beer: An Ancient Yet Modern Biotechnology. *The Chemical Educator*, 5(3), 102–112. <https://doi.org/10.1007/s00897000378a>
- Bansal, M., Dhowlaghar, N., Nannapaneni, R., Kode, D., Chang, S., Sharma, C. S., McDaniel, C., & Kiess, A. (2021). Decreased biofilm formation by planktonic cells of *Listeria monocytogenes* in the presence of sodium hypochlorite. *Food Microbiology*, 96. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103714>
- Baranyi, J., & Roberts, T. A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. Em *International Journal of Food Microbiology* (Vol. 23). [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)90157-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)90157-0)
- Beales, N. (2004). *Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: A review*. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2004.tb00057.x>
- Bertrand, R. L. (2019). *Lag Phase Is a Dynamic, Organized, Adaptive, and Evolvable Period That Prepares Bacteria for Cell Division*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/JB.00697-18>
- Bocquet, L., Sahpaz, S., Bonneau, N., Beaufay, C., Mahieux, S., Samaillie, J., Roumy, V., Jacquin, J., Bordage, S., Hennebelle, T., Chai, F., Quetin-Leclercq, J., Neut, C., & 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). <https://doi.org/10.3390/molecules24061024>
- Bridier, A., Sanchez-Vizueté, P., Guilbaud, M., Piard, J. C., Naïtali, M., & Briandet, R. (2015). Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. *Food Microbiology*, 45(PB), 167–178. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.04.015>

- Deans, S. G., & Ritchie, G. (1987). Antibacterial properties of plant essential oils. Em *International Journal of Food Microbiology* (Vol. 5). [https://doi.org/https://doi-org.ez43.periodicos.capes.gov.br/10.1016/0168-1605\(87\)90034-1](https://doi.org/https://doi-org.ez43.periodicos.capes.gov.br/10.1016/0168-1605(87)90034-1)
- di Lodovico, S., Menghini, L., Ferrante, C., Recchia, E., Castro-Amorim, J., Gameiro, P., Cellini, L., & Bessa, L. J. (2020). Hop Extract: An Efficacious Antimicrobial and Anti-biofilm Agent Against Multidrug-Resistant Staphylococci Strains and Cutibacterium acnes. *Frontiers in Microbiology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01852>
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). *Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances*. <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
- 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>
- El-Sayed, N. R., Samir, R., Abdel-Hafez, L. J. M., & Ramadan, M. A. (2020). Olive leaf extract modulates quorum sensing genes and biofilm formation in multi-drug resistant pseudomonas aeruginosa. *Antibiotics*, *9*(9), 1–19. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9090526>
- FDA. (2021). *Outbreaks of Foodborne Illness*. <https://www.fda.gov/food/recalls-outbreaks-emergencies/outbreaks-foodborne-illness>
- Flemming, H.-C., Wingender, J., Ulrich, S., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews: Microbiology*, *14*, 563–575. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>
- Galié, S., García-Gutiérrez, C., Miguélez, E. M., Villar, C. J., & Lombó, F. (2018). Biofilms in the food industry: Health aspects and control methods. Em *Frontiers in Microbiology* (Vol. 9, Número MAY). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00898>
- Gandhi, A. D., Vizhi, D. K., Lavanya, K., Kalpana, V. N., Devi Rajeswari, V., & Babujanathanam, R. (2017). In vitro anti- biofilm and anti-bacterial activity of Sesbania grandiflora extract against Staphylococcus aureus. *Biochemistry and Biophysics Reports*, *12*, 193–197. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.10.004>
- Gerhäuser, C. (2005). Broad spectrum antiinfective potential of xanthohumol from hop (*Humulus lupulus* L.) in comparison with activities of other hop constituents and xanthohumol metabolites. Em *Molecular Nutrition and Food Research* (Vol. 49, Número 9, p. 827–831). <https://doi.org/10.1002/mnfr.200500091>
- Gianotti, A., Serrazanetti, D., Sado Kamdem, S., & Guerzoni, M. E. (2008). Involvement of cell fatty acid composition and lipid metabolism in adhesion mechanism of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, *123*(1–2), 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.039>

- Giaouris, E., Heir, E., Desvaux, M., Hébraud, M., Møretrø, T., Langsrud, S., Doulgeraki, A., Nychas, G. J., Kacániová, M., Czaczyk, K., Ölmez, H., & Simões, M. (2015a). Intra- and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 6(JUL), 1–26. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00841>
- Giaouris, E., Heir, E., Desvaux, M., Hébraud, M., Møretrø, T., Langsrud, S., Doulgeraki, A., Nychas, G. J., Kacániová, M., Czaczyk, K., Ölmez, H., & Simões, M. (2015b). Intra- and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. Em *Frontiers in Microbiology* (Vol. 6, Número JUL). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00841>
- Hancock, R. E. W. (1998). *Resistance Mechanisms in Pseudomonas aeruginosa and Other Nonfermentative Gram-Negative Bacteria*. https://academic.oup.com/cid/article/27/Supplement_1/S93/459305
- Hrnčič, M. K., Španinger, E., Košir, I. J., Knez, Ž., & Bren, U. (2019). Hop compounds: Extraction techniques, chemical analyses, antioxidative, antimicrobial, and anticarcinogenic effects. Em *Nutrients* (Vol. 11, Número 2). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu11020257>
- Javan, A. J., Salimiraad, S., & Khorshidpour, B. (2019). Combined effect of trachyspermum ammi essential oil and propolis ethanolic extract on some foodborne pathogenic bacteria. *Veterinary Research Forum*, 10(3), 235–240. <https://doi.org/10.30466/vrf.2019.72986.1991>
- 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 Prum.*, 58(6), 166–170. <https://doi.org/10.18832/kp2012016>
- Kipnis, E., Sawa, T., & Wiener-Kronish, J. (2006). Targeting mechanisms of Pseudomonas aeruginosa pathogenesis. Em *Medecine et Maladies Infectieuses* (Vol. 36, Número 2, p. 78–91). Elsevier Masson SAS. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2005.10.007>
- Klimek, K., Tyśkiewicz, K., Miazga-Karska, M., Dębczak, A., Rój, E., & Ginalska, G. (2021). Bioactive compounds obtained from polish “marynka” hop variety using efficient two-step supercritical fluid extraction and comparison of their antibacterial, cytotoxic, and anti-proliferative activities in vitro. *Molecules*, 26(8). <https://doi.org/10.3390/molecules26082366>
- 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>
- 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>

- Lianou, A., Nychas, G. J. E., & Koutsoumanis, K. P. (2020). Strain variability in biofilm formation: A food safety and quality perspective. *Food Research International*, 137. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109424>
- Liu, M., Wu, X., Li, J., Liu, L., Zhang, R., Shao, D., & Du, X. (2017). The specific anti-biofilm effect of gallic acid on *Staphylococcus aureus* by regulating the expression of the *ica* operon. *Food Control*, 73, 613–618. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.09.015>
- Liu, Y. X., An, X. L., Xu, Y. N., Hao, Y. J., Piao, X. C., Jin, M. Y., & Lian, M. L. (2022). Antibacterial and antibiofilm properties of dichloromethane fraction of extracts from adventitious roots of *Eurycoma longifolia* against *Staphylococcus aureus*. *LWT*, 162. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113438>
- Maggio, F., Rossi, C., Chaves-Lópe, C., Valbonetti, L., Desideri, G., Paparella, A., & Serio, A. (2022). A single exposure to a sublethal concentration of *Origanum vulgare* essential oil initiates response against food stressors and restoration of antibiotic susceptibility in *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 132. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108562>
- Mesaros, N., Nordmann, P., Plésiat, P., Roussel-Delvallez, M., van Eldere, J., Glupczynski, Y., van Laethem, Y., Jacobs, F., Lebecque, P., Malfroot, A., Tulkens, P. M., & van Bambeke, F. (2007). *Pseudomonas aeruginosa*: Resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. Em *Clinical Microbiology and Infection* (Vol. 13, Número 6, p. 560–578). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01681.x>
- Moir, M. (2000). Hops - A millennium review. Em *Journal of the American Society of Brewing Chemists* (Vol. 58, Número 4, p. 131–146). American Society of Brewing Chemists Inc. <https://doi.org/10.1094/asbcj-58-0131>
- Mytilinaios, I., Salih, M., Schofield, H. K., & Lambert, R. J. W. (2012). Growth curve prediction from optical density data. *International Journal of Food Microbiology*, 154(3), 169–176. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.035>
- Nikaido, H., & Hancock, R. E. W. (1986). Outer Membrane Permeability of *Pseudomonas aeruginosa*. Em *The Biology of Pseudomonas* (p. 145–193). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-307210-8.50009-9>
- Pejčić, M., Stojanović-Radić, Z., Genčić, M., Dimitrijević, M., & Radulović, N. (2020). Anti-virulence potential of basil and sage essential oils: Inhibition of biofilm formation, motility and pyocyanin production of *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Food and Chemical Toxicology*, 111431. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111431>
- Poole, K., & Srikumar, R. (2001). Multidrug Efflux in *Pseudomonas aeruginosa*: Components, Mechanisms and Clinical Significance. Em *Current Topics in Medicinal Chemistry* (Vol. 1). <https://doi.org/10.2174/1568026013395605>
- Prado Martin, J. G., Porto, E., de Alencar, S. M., da Glória, E. M., Corrêa, C. B., & Cabral, I. S. R. (2013). Antimicrobial activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) against food pathogens. Em *Rev Argent Microbiol* (Vol. 45, Número 2). www.elsevier.es/ram

- Ray, B. (1986). Impact of Bacterial Injury and Repair in Food Microbiology: its Past, Present and Future. Em *Journal of Food Protection* (Vol. 49, Número 8). <https://doi.org/10.4315/0362-028X-49.8.651>
- Rodolfi, M., Marieschi, M., Chiancone, B., & Ganino, T. (2022). Assessment of the Genetic and Phytochemical Variability of Italian Wild Hop: A Route to Biodiversity Preservation. *Applied Sciences (Switzerland)*, 12(11). <https://doi.org/10.3390/app12115751>
- 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>
- Russell, N. J., Evans, R. I., ter Steeg, P. F., Hellemons, J., Verheul, A., & Abee, T. (1995). Membranes as a target for stress adaptation. Em *International Journal of Food Microbiology* (Vol. 28). [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(95\)00061-5](https://doi.org/10.1016/0168-1605(95)00061-5)
- Sakamoto, K., & Konings, W. N. (2003). Beer spoilage bacteria and hop resistance. Em *International Journal of Food Microbiology* (Vol. 89, Números 2–3, p. 105–124). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00153-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00153-3)
- Sanz, V., Torres, M. D., López Vilariño, J. M., & Domínguez, H. (2019). What is new on the hop extraction? Em *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 93, p. 12–22). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.08.018>
- Schmalreck, A. F., Teuber, M., Reininger, W., & Hartl, A. (1974). *Structural features determining the antibiotic potencies of natural and synthetic hop bitter resins, their precursors and derivatives*. <https://doi.org/10.1139/m75-029>
- Shimwell, 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(2), 191–194. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1937.tb05744.x>
- 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>
- Stompor, M., & Zarowska, B. (2016). Antimicrobial activity of xanthohumol and its selected structural analogues. *Molecules*, 21(5). <https://doi.org/10.3390/molecules21050608>
- Teuber, M., & Sehmalreck, A. F. (1973). Membrane Leakage in *Bacillus subtilis* 168 Induced by the Hop Constituents Lupulone, Humulone, Isohumulone and Humulinic Acid. Em *Arch. Mikrobiol* (Vol. 94). Springer-Verlag. <https://doi.org/10.1007/BF00416690>
- Tian, B., Cheng, J., Zhang, T., Liu, Y., & Chen, D. (2022). Multifunctional chitosan-based film loaded with hops β -acids: Preparation, characterization, controlled release and antibacterial mechanism. *Food Hydrocolloids*, 124. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107337>
- van Cleemput, M., Cattoor, K., de Bosscher, K., Haegeman, G., de Keukeleire, D., & Heyerick, A. (2009). Hop (*Humulus lupulus*)-derived bitter acids as multipotent bioactive

- compounds. Em *Journal of Natural Products* (Vol. 72, Número 6, p. 1220–1230). <https://doi.org/10.1021/np800740m>
- Verderosa, A. D., Totsika, M., & Fairfull-Smith, K. E. (2019). Bacterial Biofilm Eradication Agents: A Current Review. *Frontiers in Chemistry*, 7(November), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00824>
- Vogel, S. J., Tank, M., & Goodyear, N. (2014). Variation in detection limits between bacterial growth phases and precision of an ATP bioluminescence system. *Letters in Applied Microbiology*, 58(4), 370–375. <https://doi.org/10.1111/lam.12199>
- Wang, Y., Sun, L., Hu, L., Wang, Z., Wang, X., & Dong, Q. (2022). Adhesion and kinetics of biofilm formation and related gene expression of *Listeria monocytogenes* in response to nutritional stress. *Food Research International*, 156. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111143>
- Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. W. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3(2), 163–175. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>
- Yousef, A. Elmeleigy., & Juneja, V. K. (2003). *Microbial stress adaptation and food safety*. CRC Press.
- Zanoli, P., & Zavatti, M. (2008). Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. Em *Journal of Ethnopharmacology* (Vol. 116, Número 3, p. 383–396). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.01.011>
- Zhang, H., Guo, X., Tian, L., Wang, N., Li, Y., Kushmaro, A., Marks, R., & Sun, Q. (2022). Antibiofilm activity of 3,3'-diindolylmethane on *Staphylococcus aureus* and its disinfection on common food-contact surfaces. *Food Science and Human Wellness*, 11(5), 1222–1232. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2022.04.017>

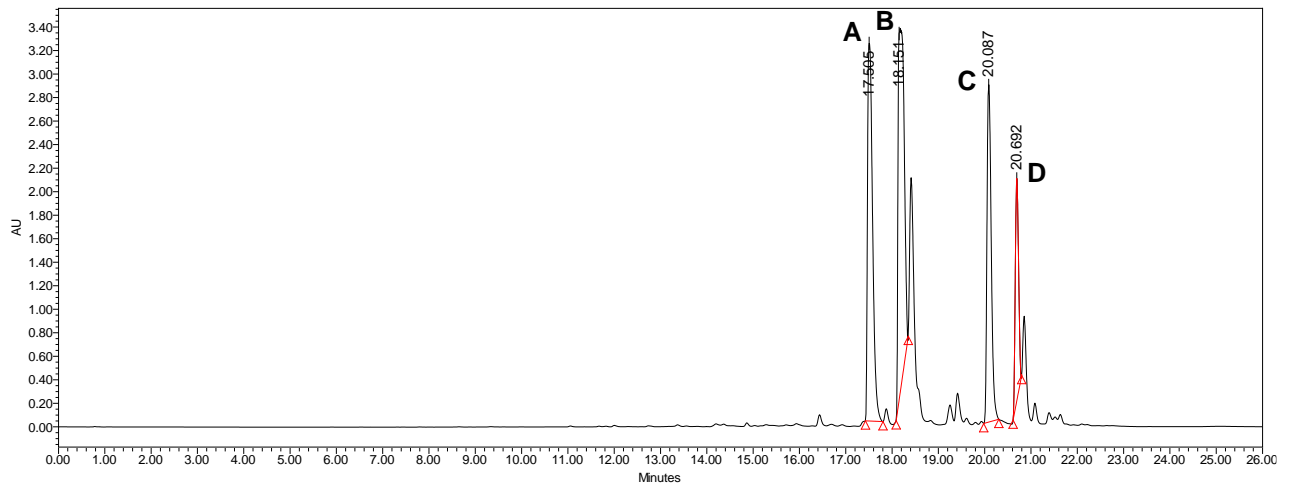
4. CONCLUSÃO

Neste trabalho, os extratos de lúpulo demonstraram exercer um efeito antimicrobiano e antibiofilme em bactérias patogênicas, sugerindo potencial para ser utilizado na indústria alimentícia como agente antiadesão no controle da formação de biofilmes. Considerando que essas comunidades bacterianas geralmente são formadas por mais de uma espécie, e são afetados por diferentes fatores físicos nos ambientes de processamento, mais investigações seriam de grande importância para elucidar questões ainda desconhecidas sobre variedades cultivadas no Brasil e seu futuro uso na indústria alimentícia como agente conservador e desinfetante de superfícies.

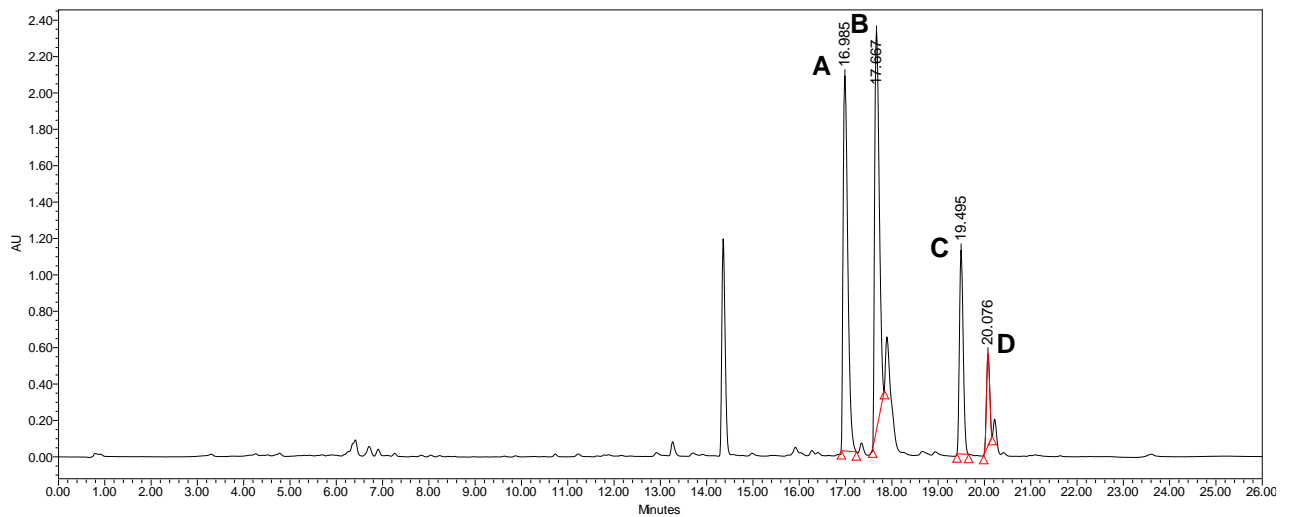
APÊNDICE

APÊNDICE A – Figura 1. Cromatogramas obtidos referentes ao (a) padrão de α - e β -ácidos e aos extratos hidroetanólicos de lúpulo das cultivares (b) Comet, (c) Polaris e (d) Brewers Gold com identificação de A: cohumulona; B: humulona+adhumulona; C: colupulona D: lupulona+adlupulona.

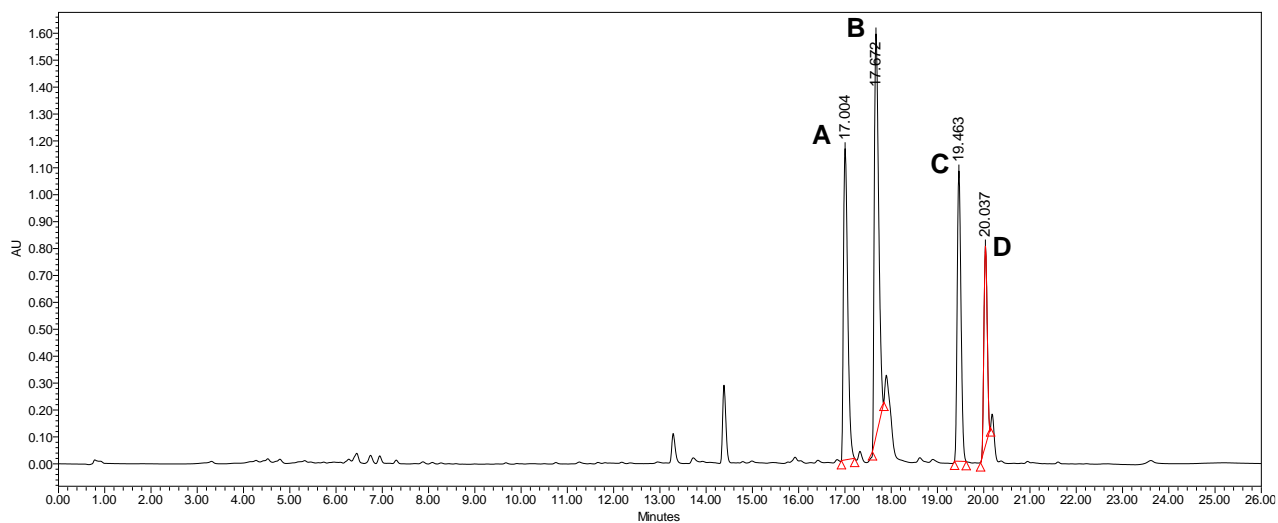
(a)



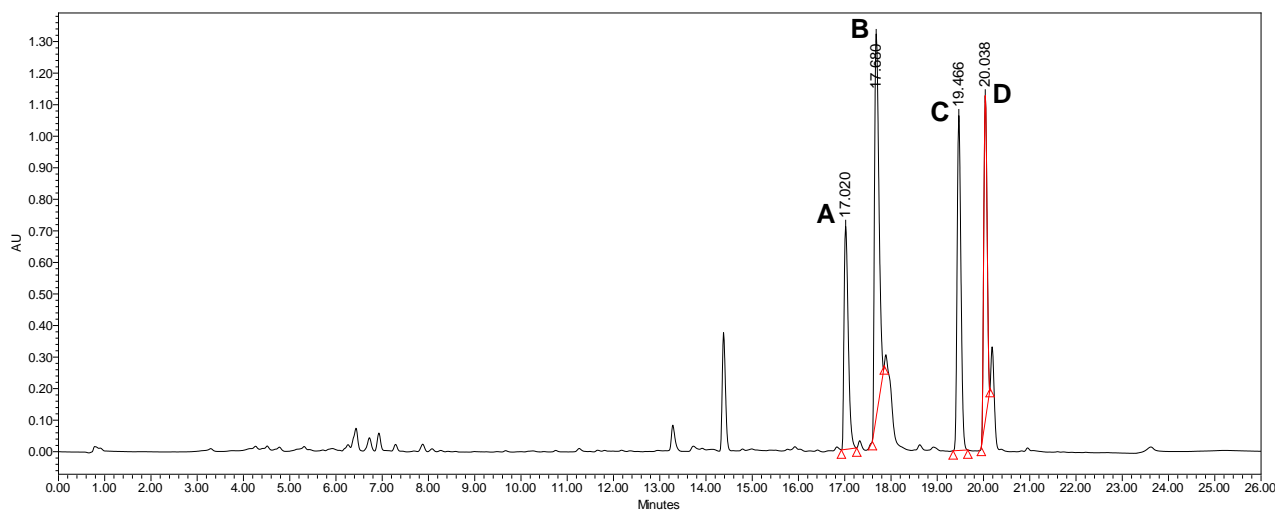
(b)



(c)



(d)



APÊNDICE B – Tabela 1. Densidade ótica (DO595nm) e respectivas % de adesão de *L. monocytogenes* ATCC 7644, *S. aureus* ATCC 6538, *E. coli* ATCC 11229, *S. Typhimurium* ATCC 14028 e *P. aeruginosa* ATCC 15442 após tratamento com diferentes concentrações subinibitórias de extratos de lúpulo (média ± desvio padrão).

Variedade	Concentração de extrato (mg.mL ⁻¹)	Bactéria		Concentração (mg.mL ⁻¹)	Bactéria		
		<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Comet	0	0.741 ± 0.072 a	0.752 ± 0.059 a	0	0.602 ± 0.029 ab	0.393 ± 0.05 a	3.722 ± 0.114 a
	0.25	0.454 ± 0.129b (62,58%)	0.161 ± 0.056bcd (21,35%)	12.5	0.320 ± 0.05 cde (53,6%)	0.192 ± 0.112 ab (47,33%)	3.271 ± 0.113 abc (87,97%)
	0.5	0.219 ± 0.129bc (28,83%)	0.037 ± 0.051d (4,88%)	25	0.159 ± 0.143 cdef (25,64%)	0.048 ± 0.064 b (13,65%)	2.887 ± 0.494 c (77,85%)
	1	0.126 ± 0.013c (17,25%)	0.03 ± 0.026d (4,16%)	50	0.062 ± 0.052 f (10,66%)	0.042 ± 0.059 b (9,7%)	3.450 ± 0.152 abc (92,83%)
Polaris	0	0.744 ± 0.074 a	0.734 ± 0.044 a	0	0.592 ± 0.047 ab	0.323 ± 0.077 ab	3.684 ± 0.18 ab
	0.25	0.419 ± 0.07 b (56,56%)	0.409 ± 0.109 bc (55,85%)	12.5	0.36 ± 0.108 abc (60,21%)	0.264 ± 0.09 ab (80,26%)	3.219 ± 0.177 abc (87,68%)
	0.5	0.273 ± 0.095 bc (36,96%)	0.186 ± 0.139 bcd (24,95%)	25	0.308 ± 0.048 cdef (52,71%)	0.160 ± 0.141 ab (43,58%)	3.388 ± 0.212 abc (91,92%)
	1	0.250 ± 0.88 bc (34,70%)	0.209 ± 0.051 bcd (28,53%)	50	0.074 ± 0.072 ef (13,15%)	0.124 ± 0.172 ab (50,31%)	3.423 ± 0.078 abc (93,12%)
Brewers Gold	0	0.809 ± 0.127 a	0.476 ± 0.23 ab	0	0.608 ± 0.097 a	0.368 ± 0.115 a	3.641 ± 0.194 ab
	0.25	0.289 ± 0.999 bc (37,42%)	0.162 ± 0.199 bcd (26,58%)	12.5	0.354 ± 0.121 bc (57,38%)	0.294 ± 0.096 ab (82,11%)	3.002 ± 0.324 bc (82,43%)
	0.5	0.381 ± 0.068 bc (47,55%)	0.208 ± 0.011 bcd (50,45%)	25	0.335 ± 0.127 cd (54,78%)	0.115 ± 0.046 ab (35%)	3.168 ± 0.271 abc (87,19%)
	1	0.19 ± 0.044 bc (24,18%)	0.130 ± 0.073 cd (34,48%)	50	0.090 ± 0.028 def (15,22%)	0.052 ± 0.09 b (12,28%)	3.334 ± 0.183 abc (91,91%)

Pares de médias seguidos por letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey p≤0,05)

