

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

FABRÍCIA ALVES VIEIRA

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO DE LÚPULO E AFINIDADE DE
SEUS ALFA ÁCIDOS AO RECEPTOR GABA_A: IMPLICAÇÕES NO
TRATAMENTO DA EPILEPSIA**

PATOS DE MINAS – MG
JANEIRO DE 2024

FABRÍCIA ALVES VIEIRA

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO DE LÚPULO E AFINIDADE DE
SEUS ALFA ÁCIDOS AO RECEPTOR GABA_A: IMPLICAÇÕES NO
TRATAMENTO DA EPILEPSIA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia.

**Orientadora: Profa. Dra. Júlia Ariana de
Souza Gomes Lenzi**

**Coorientador: Prof. Dr. Marcos de Souza
Gomes**

PATOS DE MINAS – MG

JANEIRO DE 2024

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

V658
2025
Vieira, Fabricia Alves, 1980-
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO DE LÚPULO E
AFINIDADE DE SEUS ALFA ÁCIDOS AO RECEPTOR GABAA:
IMPLICAÇÕES NO TRATAMENTO DA EPILEPSIA [recurso
eletrônico] / Fabricia Alves Vieira. - 2025.

Orientadora: Júlia Ariana de Sousa Gomes Lenzi.
Coorientador: Marcos de Sousa Gomes .
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de
Uberlândia, Pós-graduação em Biotecnologia.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2025.153>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Biotecnologia. I. Lenzi, Júlia Ariana de Sousa
Gomes, 1986-, (Orient.). II. , Marcos de Sousa Gomes,
1981-, (Coorient.). III. Universidade Federal de
Uberlândia. Pós-graduação em Biotecnologia. IV. Título.

CDU: 60

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

FABRÍCIA ALVES VIEIRA

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia.

Aprovado em: 06/02/2025

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Júlia Ariana de Souza Gomes Lenzi



Prof. Dr. Nilson Nicolau Junior



Profa. Dra. Daniele Cristina de Aguiar

AGRADECIMENTOS

A conclusão desta tese de mestrado é um marco significativo na minha trajetória acadêmica e pessoal, e não poderia alcançá-lo sem o apoio e contribuição de muitas pessoas. Primeiramente, agradeço à Deus, por sempre me abençoar e caminhar ao meu lado. À minha orientadora Profa. Dra. Júlia Arianne de Sousa Gomes Lenzi, pela orientação, paciência, dedicação e por acreditar no meu potencial desde o início deste percurso. Suas valiosas orientações e incentivo constante, foram essenciais para que eu pudesse superar os desafios e chegar até aqui.

Agradeço também ao meu coorientador, Prof. Dr. Marcos de Sousa Gomes, por sua contribuição essencial ao longo deste processo. Sua expertise e dedicação ao longo de toda a pesquisa foram imprescindíveis para o sucesso deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Nilson Nicolau Junior e Profa. Dra. Daniele Cristina de Aguiar, pelas considerações, críticas construtivas e pelo tempo dedicado à avaliação desta pesquisa. Suas observações serão fundamentais para o aprimoramento deste trabalho.

Sou grata ao meu esposo Christiano e filho Emanuel Teodoro, que sempre estiveram ao meu lado oferecendo apoio emocional e motivacional nos momentos mais difíceis. Por terem compreendido minhas ausências, e sempre apoiarem meus projetos e sonhos.

Aos parceiros e colaboradores, que tornaram possível essa pesquisa, Dra. Tamiris Sabrina Rodriguês - Campus Patos de Minas, a Dra. Raquel Maria Ferreira de Sousa do laboratório de Química da Universidade Federal de Uberlândia - Campus Uberlândia, ao Dr. Matheus de Sousa Gomes da Universidade Federal de Uberlândia - Campus Patos de Minas e ao Doutorando Carlos Bruno de Araújo. Gratidão por terem compartilhado tantas experiências e aprendizados. Cada um de vocês tiveram uma colaboração fundamental na minha jornada acadêmica.

Por fim, agradeço a todos os professores e profissionais que, ao longo da minha formação, me proporcionaram conhecimentos e experiências que foram importantes para a construção desta pesquisa. A todos, meu mais sincero e profundo agradecimento. Este trabalho é, sem dúvida, um reflexo de um esforço coletivo e de um apoio incondicional.

A cada um de vocês, meu muito obrigada!

RESUMO

A epilepsia é uma condição neurológica extremamente comum, afetando aproximadamente 50 milhões de pessoas no mundo. Caracteriza-se por episódios recorrentes de crises epiléticas, sendo responsável por um acometimento significativo de morbidade e mortalidade. O tratamento da epilepsia envolve principalmente o uso de fármacos antiepiléticos, que podem ajudar a controlar as crises epiléticas e melhorar a qualidade de vida dos portadores desta patologia. Entretanto, uma parcela importante desse público é refratária aos tratamentos existentes, sendo relevante a realização de estudos que identifiquem novos fármacos com ação antiepilética que sejam seguros e eficazes. Neste sentido, o lúpulo, uma planta da família *Cannabaceae*, conhecido pelo seu uso na fabricação da cerveja, é também utilizado como fitoterápico para o tratamento de ansiedade e distúrbios do sono. Além disso, em ensaios pré-clínicos, já foram demonstrados efeitos do lúpulo sobre outras condições patológicas que acometem o sistema nervoso central, como Alzheimer e depressão. Assim, os objetivos desse trabalho foram obter um extrato de lúpulo, caracterizar a fração de alfa ácidos do extrato através da técnica de Ressonância Magnética Nuclear, avaliar suas atividades antioxidantes *in vitro*, o teor de compostos fenólicos totais e a afinidade de ligação dos mesmos com o receptor GABA_A. Inicialmente, foi preparado o extrato de lúpulo utilizando o solvente hexano, o qual foi analisado através do equipamento de Ressonância Magnética Nuclear. Foi possível identificar três alfa ácidos no extrato, a humulona, cohumulona e adhumulona. O extrato apresentou atividade antioxidante expressiva nos métodos DPPH, de captura do cátion radical ABTS⁺, fosfomolibdênio e do poder redutor, além de elevado teor dos compostos fenólicos totais. Na análise *in silico*, através da ferramenta de *docking* molecular, foi possível observar a ligação entre os alfa ácidos identificados no extrato e o receptor GABA_A. Destaca-se que a humulona teve o melhor score de ancoragem entre os alfa ácidos avaliados. Conclui-se que o extrato de lúpulo desenvolvido nesse estudo destaca-se por sua importante atividade antioxidante e elevada concentração de alfa ácidos. Além disso, nossos resultados predizem que há ligação dos alfa ácidos ao receptor GABA_A, o que sugere que o lúpulo apresenta grande potencial para ser utilizado no tratamento da epilepsia.

Palavras-chave: Lúpulo; Epilepsia; Estresse oxidativo; *Docking*; Bioinformática.

ABSTRACT

Epilepsy is an extremely common neurological condition, affecting approximately 50 million people worldwide. It is characterized by recurrent episodes of epileptic seizures and is responsible for significant morbidity and mortality. The treatment of epilepsy mainly involves the use of antiepileptic drugs, which can help control epileptic seizures and improve the quality of life of those suffering from the condition. However, a significant proportion of this population is refractory to existing treatments, making it important to carry out studies to identify new drugs with antiepileptic action that are safe and effective. In this sense, hops, a plant from the Cannabaceae family, known for its use in brewing beer, is also used as a herbal medicine to treat anxiety and sleep disorders. In addition, pre-clinical trials have already demonstrated the effects of hops on other pathological conditions affecting the central nervous system, such as Alzheimer's and depression. Therefore, the objectives of this work were to obtain an extract of hops, characterize the alpha-acid fraction of the extract using the Nuclear Magnetic Resonance technique, evaluate its antioxidant activities *in vitro*, the content of total phenolic compounds and their binding affinity with the GABAA receptor. Initially, the hop extract was prepared using the solvent hexane, which was analyzed using Nuclear Magnetic Resonance equipment. It was possible to identify three alpha acids in the extract, humulone, cohumulone and adhumulone. The extract showed significant antioxidant activity in the DPPH, ABTS⁺ radical cation capture, phosphomolybdenum and reducing power methods, as well as a high content of total phenolic compounds. In the *in silico* analysis, using the molecular *docking* tool, it was possible to observe the link between the alpha acids identified in the extract and the GABAA receptor. It is noteworthy that humulone had the best *docking* score among the alpha acids evaluated. We conclude that the hop extract developed in this study stands out for its significant antioxidant activity and high concentration of alpha acids. In addition, our results predict that alpha acids bind to the GABAA receptor, which suggests that hops have great potential for use in the treatment of epilepsy.

Keywords: Hops, Epilepsy, Oxidative stress, *Docking*, Bioinformatics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cones de Lúpulo.....	18
Figura 2. Estrutura dos alfa ácidos e seus isômeros.	21
Figura 3. Receptores GABA _A e as suas subunidades.	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais constituintes em flores secas de lúpulo.	20
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A	Alfa
AA%	Atividade antioxidante
ABTS	2,2-azinobis-3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico
a.C	Antes de Cristo
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASBC	American Society of Brewing Chemists
Aß	Beta-amiloide
B	Beta
BHT	Butil-hidroxitolueno
Ca²⁺	Cálcio
CBD	Canabidiol
CONITEC	Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias
cRNAs	Ácidos Ribonucleicos clonados
Cu²⁺	Cobre oxidado
°C	Graus Celsius
DA	Doença de Alzheimer
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
Dra	Doutora
Dr	Doutor
&	Símbolo usado para substituir a conjunção aditiva "e"
EAG	Equivalentes de ácido Gálico
EBC	European Brewery Convention
EBHT	Equivalentes de BHT <i>et al</i> Dolatin <i>et alii</i> - e outros; e colaboradores
EMA	Agência Europeia de Medicamentos
FDA	Food and Drug Administration
Fe²⁺	Ferro oxidado
Fe³⁺	Ferro reduzido
G	Gramas
GABA	Ácido gama-aminobutírico
HEK293	Células de rim de embrião humano

μL	Microlitro
M	Concentração molar
Mbar	Unidade de pressão de fluidos (gases e líquidos) milibar
min	Minuto
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
m/m	Massa/Massa
No	Número
nm	Nanômetro
NMDA	Glutamatérgicos tipo <i>N-methyl-D-aspartato</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
pH	Potencial Hidrogeniônico
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
ppm	Partes por milhão
Prof	Professor
Profa	Professora
RMN	Ressonância Magnética
SEC	Sistema endocanabinóide
SNC	Sistema Nervoso Central
SUS	Sistema Único de Saúde
%	Porcentagem
γ	Gama
δ	Delta
ε	Épsilon
π	Pi
θ	Theta
ρ	Rho

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Problema.....	14
1.2 Hipótese.....	16
1.3 Justificativa.....	16
1.4 Objetivos.....	16
1.4.1 Objetivo geral.....	16
1.4.2 Objetivos específicos.....	17
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1 Plantas medicinais: História.....	17
2.2 Lúpulo.....	20
2.3 Composição química do lúpulo.....	21
2.4 Atuação do lúpulo no sistema nervoso central.....	24
2.5 Receptores GABAérgicos.....	24
2.6 Aplicabilidade terapêutica do lúpulo e ação GABAérgica.....	26
2.7 Epilepsia.....	28
2.8 Tratamento da epilepsia.....	29
2.9 Aplicação do lúpulo no tratamento da epilepsia.....	30
2.10 A aplicação da tecnologia computacional e sua relação com a química medicinal...31	
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33
CAPÍTULO 2.....	40
Artigo 1 - Análise do extrato de lúpulo para potencial tratamento da epilepsia: estudo computacional e atividade antioxidante	41
CONCLUSÃO.....	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
APÊNDICES.....	76
Apêndice A - Espectro de RMN- ¹³ C do extrato.....	76
Apêndice B - Expansão (154-218 ppm) de RMN- ¹³ C do extrato.....	76
Apêndice C - Expansão (102-248 ppm) do espectro de RMN- ¹³ C da amostra.....	77
Apêndice D - Expansão (5-80 ppm)do espectro de RMN- ¹³ C da amostra.....	77

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

1.1 Problema

A epilepsia é uma desordem neurológica de ampla distribuição no mundo que afeta diversos grupos etários. A frequência dos episódios de crises aumenta com o envelhecimento, comprometendo substancialmente a qualidade de vida dos pacientes (Beghi, 2019). Essa patologia caracteriza-se por crises epiléticas recorrentes espontâneas, que podem ser definidas como manifestações clínicas resultantes de descargas neuronais anormais, produzindo uma superexcitação dos neurônios. Um dos fatores que promovem sua origem é o desequilíbrio entre os mecanismos de neurotransmissão inibitórios e excitatórios (Borges *et al.*, 2017).

O neurotransmissor inibitório mais importante no Sistema Nervoso Central (SNC) é o ácido γ -aminobutírico (GABA), que se liga aos receptores ionotrópicos GABA_A e aos receptores metabotrópicos GABA_B pós-sinápticos. Esta via de neurotransmissão inibitória é altamente relevante para evitar as crises desencadeadas no quadro de epilepsia. Assim, os avanços nas pesquisas sobre a compreensão do papel dos receptores GABA_A na epilepsia e seus mecanismos de regulação são extremamente pertinentes nas pesquisas de alvos farmacológicos (Perucca; White; Bialer, 2023).

Outro fator que contribui para o início e progressão da epilepsia são os elevados níveis de radicais livres associados à particular sensibilidade do SNC ao dano oxidativo. A participação do estresse oxidativo na patogênese da epilepsia tem sido evidenciada tanto em pacientes com epilepsia, quanto em modelos experimentais de epilepsia e convulsão (Aguiar *et al.*, 2013).

Atualmente, o tratamento da epilepsia, ocorre, principalmente, pelo uso de medicamentos antiepiléticos. No início do século 20, a descoberta do fenobarbital tornou-se o marco na história moderna do tratamento farmacológico da epilepsia, o qual, juntamente com a fenitoína e seus derivados, foram expressamente empregados na primeira metade do século passado (Santulli *et al.*, 2016).

Outro grande avanço na neuropsicofarmacologia foi a inclusão dos benzodiazepínicos na década de 1960, os quais permanecem amplamente prescritos no tratamento da epilepsia. Porém, o fato de serem sedativos e produzirem dependência física, levando a sintomas de abstinência significativos na interrupção do tratamento, tem motivado o desenvolvimento de novos fármacos (Nestler; Hyman; Malenka, 2009).

Ao final do século XX, com a descoberta do sistema endocanabinoide, a *Cannabis*, antes classificada como altamente perigosa e dotada de efeitos nocivos excedentes aos eventuais benefícios terapêuticos, experienciou uma reviravolta sobre sua aplicabilidade. O canabidiol presente na planta têm sido analisado e empregado no tratamento de várias doenças (Romano e Hazekamp, 2013). Atualmente, é recomendado como terapia complementar em pacientes com epilepsia grave refratária aos tratamentos existentes (Radwan *et al.*, 2015; Gobira *et al.*, 2015).

Nesse contexto, nas últimas décadas do Século XX, o uso de plantas medicinais foi reconhecido como recurso terapêutico válido, iniciando-se as discussões sobre a sua incorporação nos sistemas de saúde pública (Gasparin, *et al.*, 2022). Dentre a diversidade de plantas medicinais utilizadas com finalidades terapêuticas, o lúpulo (espécie *Humulus lupulus* L.), da família *Cannabaceae*, tem uma longa história como planta medicinal aplicada para vários fins (Durello; Silva; Junior, 2019).

O gênero *Humulus* é composto por três espécies, *H. lupulus*, *H. japonicus* e *H. yunnanensis*. Destas, apenas o *H. lupulus* e o *H. japonicus* são cultivadas em larga escala com finalidade comercial (Wannenmacher; Gastl; Becker, 2018). Cerca de 97% da produção do lúpulo mundial é utilizada na indústria cervejeira, pois a natureza e reatividade dos compostos do lúpulo contribui para o sabor amargo característico da cerveja, bem como para a estabilidade coloidal da espuma. Além disso, atua como antioxidante e antimicrobiano, protegendo a cerveja de processos oxidativos e de contaminações microbiológicas (Taniguchi, 2015).

Além do uso na produção de cerveja, o lúpulo é empregado, desde a Roma antiga, como erva medicinal para diversas patologias, inclusive para acalmar, hipnotizar e reduzir a ocorrência de crises epiléticas (Blumenthal, 1998). As propriedades sedativas do lúpulo foram descobertas quando se observou que os trabalhadores experienciavam sonolência durante a sua colheita, aparentemente devido à transferência de resina de lúpulo de suas mãos para a boca (Tyler, 1987).

Atualmente, o lúpulo é indicado como recurso terapêutico em condições clínicas como ansiedade e insônia (Kyrrou *et al.*, 2017). Nos últimos anos, foram realizadas investigações farmacológicas *in vitro* e *in vivo* na tentativa de produzir evidências científicas dos usos tradicionais relatados do lúpulo no SNC. Os estudos pré-clínicos relacionados às vias de ação do lúpulo apontam para sua característica antioxidante, demonstrando papel significativo na redução da formação de radicais livres (Zanoli e Zavatti, 2008). Além disso, estudos indicam que os alfa ácidos, compostos presentes no lúpulo, apresentam atividade sobre a via inibitória GABAérgica (Benkherouf *et al.*, 2020).

1.2 Hipótese

Assim, a hipótese do nosso trabalho é que o extrato de lúpulo apresenta atividade antioxidante *in vitro* e que os alfa ácidos presentes no extrato se ligam ao receptor GABA_A.

1.3 Justificativa

A epilepsia, por se tratar de uma doença multifatorial complexa, envolve diversos alvos terapêuticos em busca do desenvolvimento de medicamentos antiepiléticos. Mesmo em países desenvolvidos, onde seu tratamento é acessível, cerca de 30 a 40% dos pacientes não respondem à terapêutica, tornando-se refratários ao tratamento. Podem também necessitar da associação de várias medicações e, ainda assim, apresentarem resposta insatisfatória ao tratamento (Borges, 20017).

Outro impacto negativo dos medicamentos antiepiléticos é o fato de não alterarem o prognóstico a longo prazo, e apresentarem efeitos colaterais indesejáveis, além de impactar nas comorbidades (Pereira *et al.*, 2024). Recentemente, houve um aumento significativo no desenvolvimento de tratamentos direcionados à transmissão GABAérgica, como moduladores alostéricos seletivos de subunidades, demonstrando um interesse contínuo e diversificado em direcionar o sistema GABA para tratar a epilepsia (Perucca; White; Bialer, 2023).

Nesse contexto, acredita-se que o lúpulo e/ou seus constituintes possam auxiliar no tratamento da epilepsia, uma vez que as inflorescências da planta *Humulus lupulus* apresentam substâncias químicas de interesse, como os alfa ácidos, em especial as humulonas, por atuarem no sistema GABAérgico e estarem envolvidas em diversos efeitos no SNC, incluindo efeito sedativo (Benkherouf *et al.*, 2020).

Além disso, essas substâncias apresentam importante atividade antioxidante, podendo reduzir o estresse oxidativo (Zanoli e Zavatti, 2008). Na epilepsia, estudos sugerem que o estresse oxidativo pode ter uma importante participação na etiologia da crise epilética e facilitar sua progressão, além de favorecer o aparecimento de crises epiléticas recorrentes (Freitas, 2009).

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo Geral

Investigar o potencial antioxidante e realizar análise computacional do extrato de lúpulo.

1.4.2 Objetivos Específicos

- Realizar a extração a frio do lúpulo, utilizando o solvente hexano para a obtenção do extrato;
- Avaliar as atividades antioxidantes *in vitro* do extrato de lúpulo por meio dos ensaios:
 - Método sequestro de radicais livres DPPH;
 - Método do radical catiônico ABTS;
 - Teor de compostos fenólicos totais;
 - Método do Complexo Fosfomolibdênio;
 - Método do Poder Redutor.
- Empregar a técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para a caracterização detalhada dos alfa ácidos presentes no extrato de lúpulo.
- Avaliar a afinidade de ligação entre os alfa ácidos isolados no extrato de lúpulo e o receptor GABA_A através de ferramenta de *docking* molecular.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Plantas medicinais: História

O uso terapêutico das plantas medicinais na saúde humana constitui-se como prática milenar, historicamente construída na sabedoria do senso comum que articula cultura e saúde, uma vez que esses aspectos não ocorrem de maneira isolada, mas inseridos num contexto histórico determinado. Segundo Cunha (2005), Garcia e colaboradores (1995) e Pelt (2004) registros cuneiformes sumérios e babilônicos, escritos por ordem do Rei Assurbanipal, descrevem detalhadamente os usos e aplicações de espécies vegetais ou produtos derivados como o ópio (*Papaver somniferum* L.), galbano (*Ferula galbaniflua* Boiss & Buhse), assafetida

(*Ferula assafoetida* L.), meimendro (*Hyoscyamus niger* L.) e mandrágora (*Mandragora officinalis* L.).

Há 5.000 anos a.C, os chineses elaboraram listas contendo nomes e aplicações de drogas vegetais para o tratamento de diversas doenças. No ano 2735 a.C, o Imperador Shen Nung compilou o Pent'sao Kang, descrevendo 600 espécies vegetais. Na Índia, a civilização Harappan (vale do Indo, 2.700 a 1.700 a.C) lançou as bases para a Ayurveda, um dos sistemas de medicina mais antigos ainda em uso, baseado extensivamente no emprego de vegetais para o tratamento de doenças humanas e animais (Rocha *et al.*, 2015). No contexto indiano, o Vrikshayurveda, escrito no início da era cristã, destaca-se como uma das listagens de espécies medicinais mais importantes dos povos da Índia (Pires, 1984).

No Antigo Egito, era comum o uso de espécies vegetais em rituais e com finalidade terapêutica, sendo frequente o consumo de vinho com adição de ervas medicinais. Seu uso em rituais foi constatado nos achados arqueológicos, incluindo a presença de bulbos de alho (*Allium sativum* L.) entre as oferendas mortuárias encontradas na tumba de Tut-Ankh-Amon (Metwaly *et al.*, 2021).

Parte de seu conhecimento médico das espécies vegetais está registrada nos papiros denominados “Edwin Smith”, “Kahun” e “Ebers”. O papiro de Ebers (1550 a.C) inicia com a afirmação “aqui começa o livro relativo à preparação dos remédios para todas as partes do corpo humano”. O documento é considerado como o primeiro tratado egípcio sobre o uso de plantas medicinais, descrevendo as aplicações médicas do ópio (*P. somniferum* L.), maconha (*Cannabis sativa* L.), mirra (*Commiphora myrrha* (T. Nees) Engl.), incenso (*Boswellia serrata* Roxb. ex Colebr.), sena (*Sena alexandrina* Mill.), hena (*Lawsonia inermis* L.) e babosa (*Aloe vera* (L.) Burm. f.) (Cunha, 2005).

À Grécia antiga (1.100-146 a.C) cabe os méritos da formalização de conceitos médicos importantes e da incorporação de recursos terapêuticos persas. Dentre os gregos, cuja contribuição ao uso de espécies vegetais bioativas é relevante, estão Hipócrates (460-370 a.C), Teophrastus (371-287 a.C) Galeno (129-199 a.C) e Dioscórides (40-90 d.C). Hipócrates utilizava cerca de 400 diferentes drogas, das quais 91% de origem vegetal. Galeno legou ao mundo fórmulas farmacêuticas precursoras, muitas ainda usadas na atualidade (Pires, 1984; Cunha, 2005).

A importância das plantas na medicina medieval também fica explícita quando consideramos a Matéria Médica da comunidade judia do Cairo (séculos XI – XIV). Em tais listas, constam 168 espécies vegetais, o que corresponde a 81,6% das drogas recomendadas. Em contraste, as drogas de origem inorgânica perfazem 10,6% do total, enquanto as de origem

animal apenas 7,8%. Esses percentuais de utilização refletem o uso ancestral da flora pelas comunidades judias, registrado no Talmud, no qual setenta das quatrocentas espécies vegetais citadas tem aplicações medicinais (Lev, 2007).

Já na idade moderna, por volta do Século XV, os mosteiros e conventos da Europa Medieval já haviam centralizado os conhecimentos médicos, com destaque para a Ordem Beneditina que, regidos pela Regula Benedicti, passaram a contar com enfermarias, boticas e jardins botânicos (Medeiros, 2009).

Ao longo do Século XVI, os monges através da experimentação e observação dos resultados de novos tratamentos, incluindo os herbais, ampliaram o conhecimento greco-latino contido nos trabalhos de Theophrastus, Plínio, Dioscórides e Galeno, acrescentando-lhes ilustrações e novas informações (Buenz, 2004; Pires, 1984). A esta altura, os beneditinos passaram a encarar as plantas medicinais como fontes curativas por suas propriedades medicinais intrínsecas, desfazendo desse modo a aura mística a elas atribuída (Cunha, 2005).

Theophrastus, em sua “História das Plantas”, descreve cerca de 500 drogas de origem vegetal, detalhando espécies, suas propriedades terapêuticas e toxicidade (Cunha, 2005). Dioscórides, em seu “De Matéria Médica”, faz a descrição de cerca de 600 plantas medicinais. Por sua importância e influência marcante até o Século XVIII, foi reconhecido como fundador da Farmacognosia (Riddle, 1985).

No Brasil, a utilização de espécies vegetais bioativas é anterior ao Período Colonial, integrando as práticas tradicionais das diversas nações indígenas. Há registros do consumo de produtos de origem vegetal para alimentação, tratamento de doenças e finalidades cosméticas pelos povos indígenas. Posteriormente, Gabriel Soares de Souza, em seu “Tratado Descritivo do Brasil” de 1587, denomina os produtos empregados na medicina indígena como “árvores e ervas da virtude” (Walker, 2013).

Tais espécies medicinais tiveram um marco importante em seus registros após a chegada dos jesuítas ao país. Durante o Século XIX, a participação de ordens religiosas no apontamento e uso terapêutico de recursos da flora nacional era exercida, principalmente, pelos monges da Ordem de São Bento. Nos mosteiros e abadias beneditinos, as boticas e enfermarias passaram a exercer um papel significativo no tratamento das comunidades situadas em seus entornos (Alencar, 2010; Medeiros, 2007).

Portanto, a partir da iniciativa da Organização Mundial da Saúde (OMS), o Brasil, através da Portaria do Ministério da Saúde/ Gabinete do Ministro No. 971, de 3 de maio de 2006, instituiu a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), que

estimulou a criação de hortos de espécies medicinais, bem como a implantação de seu uso no Sistema Único de Saúde (SUS) (Gasparin *et al.*, 2022).

A PNPIC impõe-se como uma estratégia inovadora, uma vez que se propõe a promover a saúde da população através do uso terapêutico da flora. Assim, atua como um elemento de resgate de valores culturais, de integração entre setores nas ações governamentais e de incentivo à formação de um vínculo efetivo entre os profissionais de saúde e as comunidades onde atuam, contribuindo para o desenvolvimento local e a participação comunitária (Antonio; Tesser; Moretti-Pires, 2013).

2.2 Lúpulo

O estudo de Duarte (2006) descreve cerca de 300.000 espécies de plantas medicinais conhecidas, dentre elas existem espécies arbóreas, aromáticas, condimentares, flores e algumas plantas daninhas que se encaixam nas plantas alimentícias não convencionais. O lúpulo (Figura 1) destaca-se dentre as espécies medicinais e a maior parte de sua produção mundial (75-80%) é atribuída a países como Alemanha (Hallertau) e Estados Unidos (Washington, Oregon e Idaho), uma vez que nestes locais podem ser encontradas as condições ótimas para seu cultivo (Durello; Silva; Junior, 2019).

Figura 1. Cones do Lúpulo.



Fonte: Science of Beer, 2020.

Pode-se destacar como condições ideais para o cultivo de lúpulo, solos argilosos ou arenosos profundos e de fácil drenagem, pois as raízes da planta podem atingir mais de 2 metros de profundidade. Além disso, a alta exposição à luz durante o crescimento da planta é importante, uma vez que necessitam de 15 a 18 horas de sol por dia, além de clima frio (Neve, 1991). Em função destas exigências de clima e solo para cultivo, acreditava-se que não era possível cultivar lúpulo no Brasil. Entretanto, existem algumas iniciativas para a produção de

lúpulo em diferentes cidades das regiões sul, sudeste, norte e nordeste do país, que derrubaram o mito da impossibilidade de se cultivar e produzir lúpulo no Brasil (Aquino *et al.*, 2022).

É importante destacar que fatores como a variedade do lúpulo, o local e as técnicas de cultivo, o grau de maturação no momento da colheita, além de fatores pós-colheita, como secagem, peletização e armazenamento podem levar a variações na proporção de seus constituintes (Astray *et al.*, 2020).

2.3 Composição química do lúpulo

A análise das características químicas do lúpulo foi inicialmente desvendada por Hayduck em 1888. Esta pesquisa descreveu, pela primeira vez, as resinas do lúpulo, as quais foram denominadas de frações α , β e γ . A nomenclatura para cada fração considerava a solubilidade da respectiva fração em diferentes solventes, além de sua capacidade de formar um precipitado na presença de acetato de chumbo (Ross, 2009).

No decorrer dos anos, a nomenclatura das frações das resinas do lúpulo modificou-se bastante e, em 1897, o termo resina- γ tornou-se obsoleto. Desde então, essa fração tem sido chamada apenas de resina dura. Em 1957, foi estabelecida uma proposta conjunta de nomenclatura para as frações das resinas do lúpulo entre a European Brewery Convention (EBC) e a American Society of Brewing Chemists (ASBC). Tal recomendação passou por uma revisão no ano de 1969, e, desde então, a nomenclatura definida permanece a mesma (Karabín, 2015).

Portanto, a resina total do lúpulo pode ser desmembrada em resinas macias e duras. As resinas macias são aquelas que apresentam solubilidade em hexano e constituem de 10-25% das resinas totais, enquanto as resinas duras são aquelas que não se solubilizam em hexano e constituem de 3-5% do peso total do lúpulo. Suas propriedades químicas e físicas diferenciam-se bastante. Nas resinas macias encontra-se os ácidos amargos do lúpulo, constituídos de uma mistura de alfa ácidos e beta ácidos (humulonas e lupulonas, respectivamente), que podem corresponder a 5-21% da massa total do lúpulo em base seca. Os alfa ácidos, por sua vez, constituem de 1,5-13% da massa total das resinas macias, como demonstrado a seguir (Tabela 1), (Houghs *et al.*, 1982).

Tabela 1. Principais constituintes em flores secas de lúpulo.

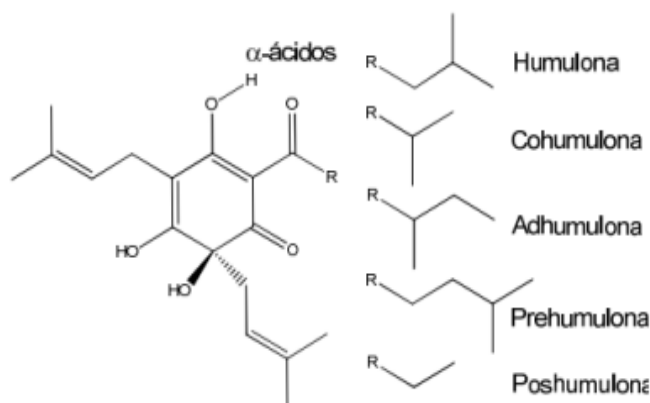
Constituinte	Quantidade % (m/m)
Resinas totais	15-30
Resinas duras totais:	3-5
Resinas macias totais:	10-20
Alfa ácidos	5-13
Beta ácidos	5-15
Óleos essenciais	0,5-3
Proteínas	15
Monossacarídeos	2
Polifenóis	4
Pectinas	2
Aminoácidos	0,1
Ceras e esteroides	Traços-25
Cinzas	8
Água	10
Celulose/lignina	43

Fonte: Stevens; Page, 2004; Guimarães, 2021.

O teor de alfa ácidos no lúpulo é muito dependente do cultivo e, em média, representa de 9-10% da massa do lúpulo em base seca, embora já existam no mercado lúpulos com mais de 20% de alfa ácidos. Destaca-se a variedade alemã denominada de lúpulo “Polaris”, que pode apresentar teores de alfa ácidos de 18-23% (Healey, 2016).

A fração dos alfa ácidos é composta por uma mistura de cinco humulonas análogas, sendo os seus principais constituintes a humulona (35-70% do total de alfa ácidos), a cohumulona (20-55%), a adhumulona (10-15%), a prehumulona (1-10%) e a poshumulona (1-3%) (Figura 2). A estrutura molecular beta-tricarbonil conjugada das humulonas é responsável pelas suas principais propriedades físico-químicas, apresentando atividade antioxidante de sequestro do radical livre DPPH e de inibição da peroxidação lipídica (Karabín *et al.*, 2016).

Figura 2. Estrutura dos alfa ácidos e seus isômeros.



Fonte: Fischer, 2021.

Por definição, a resina dura é a porção da resina total que é solúvel em metanol e éter dietílico, mas insolúvel tanto em hexano quanto em hidrocarbonetos parafínicos de baixo ponto de ebulição. É geralmente aceito que as resinas duras surgem por oxidação das resinas macias, isto é, à medida que o lúpulo envelhece durante o armazenamento, a porcentagem de resina macia cai, enquanto a da resina dura aumenta (Briggs *et al.*, 2004).

No entanto, existem pesquisas que mostram que existem resinas duras no lúpulo mesmo no estágio inicial de desenvolvimento. Portanto, é necessário diferenciar entre a resina dura nativa do lúpulo e aquela que surge pela auto-oxidação da resina macia durante a secagem e o armazenamento. Sendo assim, as informações relativas à caracterização química das resinas duras ainda carecem de mais estudo (Durello; Silva; Junior, 2019).

No início da década de 1960, Burton e Stevens propuseram a existência de duas frações nas resinas duras e as denominaram de resina dura- α e resina dura- β . Separações por cromatografia de troca iônica da resina dura- α revelaram a presença de pequenas quantidades de humulonas que não solubilizaram completamente no fracionamento com hexano no momento da obtenção das resinas macias. Entretanto, nem toda a composição da resina dura- α é composta apenas de humulonas (Almaguer *et al.*, 2014).

A resina dura- β constitui a maior parte da resina dura total. O prenilflavonóide xanthohumol (0,3-1,5%) é o componente majoritário da resina dura- β . Além do xanthohumol podem ainda ser encontradas na composição da resina dura- β outras 13 chalconas relacionadas: desmetilxanthohumol, xantogalenol, 4'-O-metilxanthohumol, 3'-geranilchalconaringenina, 3',5'-diprenilchalconaringenina, 5'-prenilxanthohumol, flavokawina, xanthohumol B, xanthohumol C, xanthohumol D, xanthohumol E, α , β -dihidroxanthohumol e isodehidrocicloxanthohumol hidratado (Karabín *et al.*, 2016).

Em relação aos flavonoides, estes são a classe quimicamente mais diversificada e difundida de compostos fenólicos da natureza, com diferentes funções metabólicas nas plantas, desde absorção de radiação ultravioleta, polinização, defesa contra bactérias e fungos, entre outras. Os flavonoides normalmente encontrados no lúpulo são as formas glicosiladas de quercetina, kaempferol, morina e miricetina (Bocquet, 2018).

2.4 Atuação do lúpulo no sistema nervoso central

Sabe-se que o lúpulo apresenta diversos efeitos sobre o SNC comprovados tanto por evidências clínicas quanto pré-clínicas, em especial os alfa ácidos existentes no lúpulo. Estudos descrevem suas propriedades sedativas e hipnóticas (Zanoli *et al.*, 2005; Schiller *et al.*, 2006), indicando seu principal papel na atividade promotora do sono previamente relatada em modelos animais (Lee *et al.*, 1993) e humanos (Dimpfel e Suter, 2008).

O estudo de Sasaoka e colaboradores (2014) analisou sua aplicabilidade na prevenção e tratamento da doença de Alzheimer provocada por acúmulo do peptídeo beta-amiloide (A β). Extratos de flores de lúpulo foram testados em modelo animal de doença de Alzheimer e foi observado inibir parcialmente a produção de A β , apoiando a ideia de uma estratégia plausível para reduzir o risco de desenvolver essa doença.

Outra investigação terapêutica recente que envolve a atuação do lúpulo no SNC, é no tratamento da depressão. O estudo de Rodrigues e colaboradores (2023) promoveu características de estados de depressão em um modelo animal de fibromialgia induzido por injeções repetidas de reserpina em ratos Wistar, com o intuito de avaliar possíveis efeitos de injeções de extrato hidroalcoólico de lúpulo, o qual apresentou resultados eficazes ao reverter as alterações comportamentais relacionadas à depressão produzidas pela reserpina.

2.5 Receptores GABAérgicos

A neurotransmissão inibitória do SNC é mediada principalmente pelo neurotransmissor GABA. A descoberta deste neurotransmissor ocorreu em 1950 por Eugene Roberts e Sam Frankel (Ghit *et al.*, 2021). Nos vertebrados, os receptores GABA são encontrados primeiramente nas membranas de células nervosas e, de forma eficaz, estão praticamente espalhados por todos os neurônios do SNC. Estão também expressos em astrócitos, e localizados nas áreas do hipocampo, mesencéfalo medial, amígdala, além da matéria cinzenta periaquedutal (Nestler; Hyman; Malenka, 2009).

O neurotransmissor GABA está presente, ainda, em diversos interneurônios inibitórios espalhados ao longo de neurônios de projeção em todo o cérebro, atuando nos espaços entre os neurônios (sinapses), mas também podem se localizar em locais extra - sinápticos. Fora do SNC, ele é encontrado em neurônios relacionados ao sistema nervoso autônomo, no fígado, nos músculos lisos das vias aéreas do pulmão e em vários tipos de células imunológicas (Ghit *et al.*, 2021).

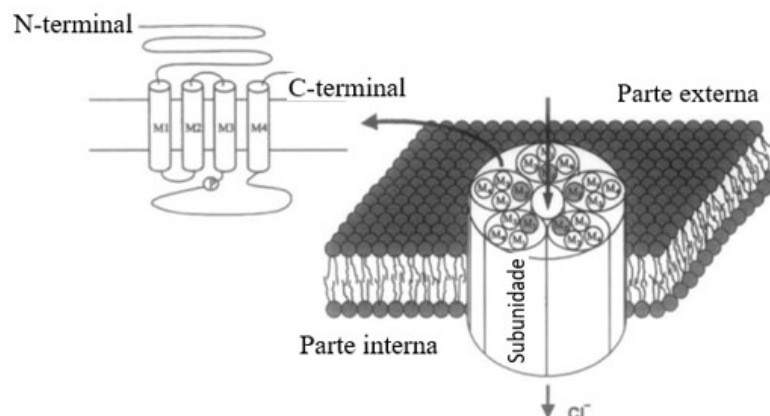
Nos vertebrados, existem dois tipos de receptores GABA, os ionotrópicos GABA_A, que atuam na permeabilidade do íon cloro, e os receptores GABA_B, que, acoplados à proteína G, regulam a atividade dos canais de potássio e cálcio. Tal separação farmacológica funcional deu-se pelos mecanismos de segundo mensageiro, diferença de localização e sua composição molecular (Watanabe *et al.*, 2002).

O receptor GABA_A, membro da superfamília Cys-loop de canais iônicos, como muitos outros canais dependentes de ligantes, é um complexo proteico heteropentâmero, que compreende cinco subunidades distintas. Até o momento, há o registro de vinte subunidades diferentes: $\alpha 1$ - $\alpha 6$, $\beta 1$ - $\beta 4$, $\gamma 1$ - $\gamma 3$, δ , ϵ , π , θ e $\rho 1$ - $\rho 3$. Sua ativação resulta em um aumento do tempo médio de abertura do canal de cloro, causando uma hiperpolarização do neurônio pós-sináptico e consequente inibição neuronal (Perucca; Bialer; White, 2023).

Experimentos utilizando técnicas de imunofluorescência sugerem que há uma alta expressão das subunidades $\alpha 1$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ e $\gamma 2$ ao longo do cérebro e que exista especificidade na expressão dos receptores GABA_A entre diferentes localizações de neurônios (Whiting, 2003). A combinação das subunidades $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ do receptor GABA_A é a mais abundante, porém, vale ressaltar que as combinações $\alpha 3\beta 3\gamma 2$ e $\alpha 2\beta 3\gamma 2$ também são altamente prevalentes no cérebro adulto (Zhu *et al.*, 2018).

Em sua estrutura, identificam-se vários sítios de união para diferentes compostos que podem modular sua atividade, como ilustra a figura 3. Dessa forma, as drogas podem influenciar as funções GABAérgicas interagindo de forma diferente, tanto em sítios pré como pós-sinápticos, porém, na maioria dos casos, os efeitos pré-sinápticos das drogas não envolvem interação com receptores GABAérgicos. Estudos sobre a ação das drogas nos sítios pré-sinápticos envolvem o efeito inibitório sobre as enzimas presentes na síntese do GABA, em sua degradação e na recaptação neuronal do próprio GABA (Nestler; Hyman; Malenka, 2009).

Figura 3. Receptores GABA_A e as suas subunidades.



Fonte: Fig. 3: Esquema do complexo GABA_A - canal iônico Cl e suas subunidades (adaptado de Watanabe, *et al.*, 2002).

Os receptores GABA_A e suas diversas composições de subunidades exibem diferentes propriedades farmacológicas de controle de canal. Eles são expressos diferencialmente durante o desenvolvimento e, no cérebro adulto, acumulam-se em distintas superfícies de células neuronais, estando sujeitos à regulação diferencial por sinais extracelulares (Luscher; Fuchs; Kilpatrick, 2011).

Presumivelmente, a distribuição diferencial dos subtipos de receptores no cérebro é crucial. Sabe-se que os vários subtipos de receptores estão localizados em diferentes regiões do cérebro e esses parâmetros, sem dúvida, determinam a contribuição de cada subtipo de receptor para funções de nível superior. Além disso, o uso de técnicas de biologia molecular revelou que um único aminoácido pode ser responsável por uma profunda diferença de afinidade entre o receptor e as diversas subunidades dos receptores GABA_A, sem afetar nenhuma outra propriedade do receptor nos neurônios (Zhu *et al.*, 2018).

Neste contexto, as atividades sedativa e hipnótica do lúpulo tem sido atribuída à modulação positiva da função do receptor GABA_A demonstrada tanto com extratos de lúpulo (Aoshima *et al.*, 2006) quanto com frações de alfa ácidos (Benkherouf *et al.*, 2020). Porém, mais pesquisas são necessárias para determinar o local preciso de ação dessas moléculas bioativas nesses receptores, auxiliando na compreensão dessa interação.

2.6 Aplicabilidade terapêutica do lúpulo e ação GABAérgica

Na Alemanha, um comitê de especialistas, a Comissão E, a qual avalia a segurança e a eficácia de mais de 300 ervas, aprovou a utilização do lúpulo no tratamento de distúrbios do humor, como inquietação, ansiedade e distúrbios do sono (Blumenthal, 1998).

Em 2006, Schiller e colaboradores. mostraram que os alfa ácidos e beta ácidos, isolados do óleo de lúpulo, desempenham um papel importante nos efeitos sedativos do lúpulo. Os autores observaram que os extratos contendo alfa ácido em doses mais altas foram capazes de aumentar o tempo de sono induzido pela cetamina em camundongos, bem como reduzir a atividade locomotora.

A modulação positiva do GABA promovida pelos componentes alfa ácidos isolados, humulona, cohumulona e adhumulona trouxe uma base farmacológica para as propriedades sedativas observadas em estudos anteriores. De fato, o estudo de Aoshima e colaboradores (2006) descreveu a modulação positiva de respostas induzidas por GABA em receptores GABA_A, observado por extratos de cerveja e lúpulo. Foi examinado o efeito da cerveja e do extrato de lúpulo nos receptores GABA expressos em oócitos *de Xenopus* por meio da injeção de Ácidos Ribonucleicos clonados (cRNAs) de subunidades α_1 e β_1 de GABA bovinos. Após a aplicação de GABA e cerveja, observou-se resposta elétrica clara confirmando sua expressão.

Mais tarde, estudos *in vivo* mostraram que os extratos de alfa ácidos, principalmente de humulona (35-70%), cohumulona (20-65%) e adhumulona (10-15%), também exibiram atividade sedativa ao aumentar o tempo de sono induzido por pentobarbital em ratos, mas sem impacto na atividade locomotora (Zanoli e Zavatti, 2008). Dado a função bem estabelecida da subunidade α_1 e seus efeitos sedativos mediados por receptores GABA_A (Rudolph *et al.*, 1999), a interação funcional de humulona com receptor GABA_A foi confirmada eletrofisiologicamente em receptores GABA_A $\alpha_1\beta_3\gamma_2$ recombinante expressos em células HEK293 (Benkherouf *et al.*, 2020).

Importante destacar que o estudo de Benkherouf e colaboradores (2020) também observou fracos efeitos modulatórios com cohumulona e adhumulona, sugerindo que, provavelmente, a atuação desses alfa ácidos na sedação é menor em comparação com a humulona. Postula-se que, por esta razão, outro estudo em ratos não observou a diminuição da locomoção dos mesmos ao utilizar o extrato de alfa ácido (Zanoli e Zavatti, 2008).

Assim, a capacidade da humulona, um dos principais compostos do lúpulo, de exibir efeitos sedativos/hipnóticos e atuar como um modulador alostérico positivo dos receptores GABA_A apoia o papel substancial da humulona na atividade indutora do sono do lúpulo e traz mais informações sobre o provável mecanismo de ação envolvido nesse efeito (Benkherouf *et al.*, 2020).

2.7 Epilepsia

O mais antigo relato descrito sobre epilepsia encontra-se em um manuscrito no museu britânico, por volta de 2000 a.C., no qual descreve a epilepsia como um castigo de Deus associado a nomes de espíritos do mal. Mais tarde, o conceito sobre epilepsia apareceu na Grécia antiga, há 400 anos a.C., onde ela não era nem sagrada nem divina, mas um distúrbio do cérebro, com suspeita de que sua origem fosse hereditária (Moreira, 2004).

Os mecanismos de ativação, propagação e manutenção da crise epilética são amplamente estudados, porém pouco conhecidos, sendo que aproximadamente 50% dos casos são idiopáticos. Sabe-se apenas que as crises epiléticas são ocasionadas por comportamento anormal de grupos de neurônios no cérebro, fazendo com que a fisiopatologia da epilepsia continue a ser um objetivo de pesquisa. Seu acometimento é expressivo, afetando de 0,5% a 1% da população (Weiner e Goetz, 2003).

As principais hipóteses propostas para explicar os mecanismos fisiopatológicos da epilepsia incluem a ativação de um grupo de neurônios simultaneamente, gerando interrupção das ligações inibitórias entre os grupos de neurônios cerebrais, bem como descontrole nos canais iônicos na excitação e bloqueio das sinapses. Já foram identificadas canalopatias em canais de sódio e potássio, além de mutações na codificação de subunidades de receptores GABAérgicos (Pedley, 2006).

Os mecanismos GABAérgicos que têm sido apontados na fisiopatologia da epilepsia incluem o comprometimento da liberação pré-sináptica de GABA, alterações nos receptores, deficiência na síntese de GABA e perda neuronal. Estas alterações determinam anormalidades na excitabilidade elétrica de membranas neuronais, favorecendo despolarização e hiperexcitabilidade neuronal, levando ao aparecimento das crises (Zhu *et al.*, 2018).

Outro fator fortemente relacionado à epilepsia é o estresse oxidativo. A modificação dos gradientes iônicos que ocorre no cérebro de um paciente epilético causa uma hiperativação dos receptores glutamatérgicos tipo *N-methyl-D-aspartato* (NMDA), promovendo um acréscimo do influxo de Ca^{2+} na célula. Dessa forma, ocorre um aumento exacerbado da excitabilidade neuronal, contribuindo para ocorrência de estresse oxidativo, uma vez que o Ca^{2+} pode ativar uma série de enzimas (incluindo proteína cinase C, proteases, fosfatases, fosfolipases e xantina oxidase) produzindo espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio (Coelho, 2016).

Partindo desta premissa, na epilepsia, ocorre um importante dano neuronal em diversas áreas encefálicas. Desse modo, o aumento exacerbado de radicais livres, somado à diminuição

na atividade de enzimas antioxidantes, que ocorre durante os processos de crises epilépticas, têm sido implicados no estabelecimento da epilepsia (epileptogênese), aumentando as chances de ocorrência de novas crises. Estudos também sugerem a participação do estresse oxidativo na refratariedade ao tratamento farmacológico da epilepsia em modelos experimentais e em humanos (Bellissimo *et al.*, 2001; Cardenas *et al.*, 2013).

Os elevados níveis de radicais livres associados a particular sensibilidade do SNC ao dano oxidativo fazem do cérebro um órgão alvo das lesões oxidativas. Essa disposição acontece em virtude deste utilizar grande quantidade de oxigênio em relação aos outros órgãos, apresentar elevado teor de ácidos graxos poli-insaturados, que são alvos da peroxidação lipídica, ser rico em ferro, que participa da catalização do radical hidroxil e exibir baixa atividade da catalase. No entanto, os mecanismos correlacionando o estresse oxidativo à resistência farmacológica carecem de uma investigação mais aprofundada (Shin *et al.*, 2011).

2.8 Tratamento da epilepsia

As drogas antiepilépticas são a base do tratamento da epilepsia. Elas agem suprimindo e controlando as crises epilépticas, porém não são capazes de reverter a neuropatologia subjacente ao processo de epileptogênese. Por esse motivo, cerca de 30% dos pacientes não apresentam resposta terapêutica satisfatória, apesar do aumento do uso de novos fármacos antiepilépticos com diferentes mecanismos de ação nas últimas duas décadas (Chen *et al.*, 2018).

De modo geral, os mecanismos de ação dos fármacos utilizados no tratamento das crises epilépticas enquadram-se em três categorias, a redução das deflagrações repetitivas e persistentes dos neurônios, o aumento da inibição sináptica mediada pelo neurotransmissor GABA e um efeito mediado por ação pré ou pós-sináptica de inibição dos canais de cálcio ativados por voltagem (Goodman; Gilman, 2015).

Na década de 1950, foi sintetizado o primeiro benzodiazepínico, o clordiazepóxido. Em 1977 surgiram, entre outras drogas, vários outros benzodiazepínicos, como o diazepam, flunitrazepam e clonazepam, os quais tornaram-se os medicamentos mais prescritos em todo o mundo. Eles foram apreciados não apenas por suas propriedades ansiolíticas, mas também por sua utilidade na insônia, agitação, crises epilépticas, espasmos musculares e na abstinência de álcool. Sua eficácia foi estabelecida por meio de ensaios clínicos das décadas de 1960 a 1990 (Balon *et al.*, 2020).

O marco dos benzodiazepínicos ocorreu pela sua capacidade de intensificar os efeitos do GABA, observada na década de 70. Pouco tempo depois, descobriram que eles também potencializavam a transmissão sináptica inibitória GABAérgica por ligação diretamente ao receptor GABA_A, tornando-se promissores no tratamento da epilepsia. A ligação dos benzodiazepínicos é claramente distinta do sítio de ligação ao GABA, sendo, portanto, um sítio modulatório alostérico no receptor GABA_A (Nestler; Hyman; Malenka, 2009).

Uma alternativa terapêutica aprovada recentemente para o tratamento da epilepsia é a *Cannabis sativa*, que tem sido usada há séculos para o tratamento de diferentes condições patológicas e é capaz de afetar significativamente a excitabilidade do SNC, agindo na neurotransmissão GABAérgica tanto no nível pré quanto pós-sináptico. Um de seus compostos, o canabidiol (CBD), foi aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) e pela Agência Europeia de Medicamentos (EMA) em 2018 como recurso terapêutico para três neuropatologias diferentes caracterizadas por crises epiléticas recorrentes espontâneas farmacorresistentes, a síndrome de Dravet, síndrome de Lennox-Gastaut e complexo de esclerose tuberosa (Ruffolo *et al.*, 2022).

No Brasil, o uso do CBD para fins medicinais foi legalizado em 2015 pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), baseado na Resolução nº 2.113, de 30 de outubro de 2014, que autoriza a prescrição e a importação de produtos à base de CBD para tratamentos específicos, principalmente para pacientes com epilepsia refratária. Desde 2022, 14 produtos derivados da *Cannabis* podem ser fabricados e comercializados em farmácias brasileiras, porém, eles não são padronizados pelo SUS, pois a Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias (CONITEC), após analisar as evidências e custo-benefício do único produto de *Cannabis* disponível e licenciado à época para comercialização no Brasil, não o recomendou ao SUS (Brasil, 2021).

Partindo do contexto atual, o estudo de Chen e colaboradores (2018) ressalta que as pesquisas futuras devem se concentrar em tratamentos que possam modificar o desenvolvimento ou a progressão da epilepsia, com novas abordagens terapêuticas em especial na epileptogênese da epilepsia, pois os fármacos antiepiléticos atuais atuam como supressores das crises epiléticas e não como modificadores da doença (Kaminski *et al.*, 2014).

2.9 Aplicação do lúpulo no tratamento da epilepsia

A investigação de propriedades terapêuticas em compostos naturais tem ganhado grande espaço nas pesquisas científicas, uma vez que esses compostos agem de diversas formas

nos sistemas biológicos. Nesse contexto, estudos descrevem o lúpulo como uma alternativa para o desenvolvimento de fármacos seguros e eficazes, devido seu promissor potencial terapêutico, em especial nas patologias que afetam o funcionamento do SNC, como a epilepsia (Zanoli e Zavatti, 2008).

Essa observação corrobora com o estudo de Benkherouf e colaboradores (2020), no qual foi descrito que a fração de humulona exibe atividade GABAérgica modulatória potente em baixas concentrações micromolares nas membranas do prosencéfalo de ratos. Posteriormente, usando camundongos BALB/c, os autores observaram comportamento hipnótico da humulona. Além disso, a humulona, destaca-se pela sua atuação antioxidante, devido suas principais propriedades físico-químicas e característica de ácido fraco, dentre elas a capacidade de quelar metais como Fe^{2+} e Cu^{2+} , resultando na redução da formação de espécies reativas de oxigênio. Observa-se inclusive sua habilidade no sequestro do radical livre DPPH e inibição da peroxidação lipídica (Durello; Silva; Junior, 2019).

Esses atributos têm sido elucidados em estudos como promissores no tratamento da epilepsia, uma vez que o estresse oxidativo está associado à piora da crise epiléptica e da progressão da epilepsia (Liu *et al.*, 2010). Portanto, a extensa gama de atividade biológica dos compostos contidos no lúpulo reforçam seu potencial como medicamento antiepiléptico, uma vez que estas substâncias apresentam uma atividade antioxidante expressiva e de modulação do sistema GABAérgico, os quais possuem um papel primordial na etiologia das epilepsias (Kawalska *et al.*, 2022).

2.10 A aplicação da tecnologia computacional e sua relação com a química medicinal

Atualmente, a utilização de recursos computacionais trabalha em conjunto com a química experimental, visando esclarecer hipóteses sobre a aplicabilidade de estruturas químicas em diversos tratamentos (Raupp, 2008). Essas ferramentas identificam compostos com propriedades desejadas, utilizando intuição e experiência química de uma forma matematicamente quantificada e computadorizada, para posterior seleção de compostos promissores para testes em laboratório e síntese de novos fármacos (Arroio, Honório, Silva; 2010).

A técnica computacional conhecida como *docking* molecular, utiliza a estrutura 3D de duas moléculas, do ligante e seu alvo, conseguindo prever a melhor posição e conformação do primeiro em relação ao segundo, para a formação de um complexo estável. Através do *docking*, é possível estipular a força da interação entre duas moléculas e, por conseguinte, pode-se avaliar

qual dos ligantes estudados vai apresentar uma maior atividade frente a um alvo farmacológico conhecido (Crampon *et al.*, 2021).

Essa análise denominada *in silico* vem sendo usada pelas indústrias farmacêuticas como uma alternativa para diminuir o tempo e o custo provenientes do desenvolvimento de novos medicamentos, funcionando como um filtro complexo que evidencia apenas os candidatos mais interessantes dentro dos parâmetros estabelecidos. A baixa taxa de sucesso na conversão de compostos principais em medicamentos, impulsiona ainda mais a aplicabilidade dessa técnica (Kadan, 2007). Partindo dessa premissa, nosso estudo utilizou uma ferramenta que possibilitou a aplicação desse método.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, C.C. *et al.* Effects of agomelatine on oxidative stress in the brain of mice after chemically induced seizures. **Cellular and Molecular Neurobiology**. v. 33 n. 6, p. 825-835, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10571-013-9949-0>
- ALENCAR, N. L.; MEDEIROS, P. M.; MEDEIROS, M. F.T. Medicinal Plants Prescribed in the Hospital of the São Bento Monastery between 1823 and 1824 in Olinda – Northeastern Brazil. **The Open Complementary Medicine Journal**. v. 2, p. 74-79, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1876391X01002020074>
- ALMAGUER, C. *et al.* *Humulus lupulus* - a story that begs to be told. A review. **Journal of the Institute of Brewing**. v. 120, p. 289–314, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jib.160>
- ANTONIO, G. D.; TESSER, C. D.; MORETTI-PIRES, R. O. Contribuições das plantas medicinais para o cuidado e a promoção da saúde na atenção primária. **Interface - Comunicação Saúde Educação**. v. 17, n. 46, p. 615-633, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1414-32832013005000014>
- AOSHIMA, H. *et al.* Effects of beer and hop on ionotropic gamma-aminobutyric acid receptors. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 54, n.7, p.2514-2519, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf051562a>
- AQUINO, A. M. *et al.* **Produção de lúpulo na Região Serrana Fluminense: manual de boas práticas**. Nova Friburgo, RJ: Associação Comercial, Industrial e Agrícola de Nova Friburgo - ACIANF, 2022. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1144201/1/Manual-de-boas-praticas-de-Lupulo.pdf>. Acesso em: 20 de novembro 2023.
- ARROIO A.; Honório K. M.; Silva, A. B. F. da. Propriedades químico-quânticas empregadas em estudos das relações estrutura-atividade. **Química Nova**. v. 33, n. 3, p. 694–699, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000300037>
- ASTRAY, G. *et al.* *Humulus lupulus* L. as a Natural Source of Functional Biomolecules. **Applied Sciences**. v. 10, n. 15, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/app10155074>
- BALON, R. *et al.* The rise and fall and rise of benzodiazepines: a return of the stigmatized and repressed. **Braz Journal of Psychiatry**. v. 42, n. 3, p. 243-244, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1516-4446-2019-0773>
- BEGHI, E. The epidemiology of epilepsy. **Neuroepidemiology**. v. 2, n. 54, p. 185-191, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000503831>
- BELLISSIMO, M. I. *et al.* Superoxide dismutase, glutathione peroxidase activities and the hydroperoxide concentration are modified in the hippocampus of epileptic rats. **Epilepsy Research**. v. 46, n. 2, p.121–128, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0920-1211\(01\)00269-8](https://doi.org/10.1016/S0920-1211(01)00269-8)

BENKHEROUF, A. Y. *et al.* Humulone Modulation of GABA_A Receptors and Its Role in Hops Sleep-Promoting Activity. **Frontiers in Neuroscience**. v. 14, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.594708>

BLUMENTHAL, M. The Complete German Commission E Monographs: Therapeutic Guide to Herbal Medicines. **Annals of Internal Medicine**. v. 130, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.7326/0003-4819-130-5-199903020-00024>

BOCQUET, L. *et al.* *Humulus lupulus* L., a very popular beer ingredient and medicinal plant: overview of its phytochemistry, its bioactivity, and its biotechnology. **Phytochemistry Reviews**. v. 17, p. 1047–1090, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11101-018-9584-y>

BORGES, J. F. C. *et al.* Epilepsia refratária ao tratamento farmacológico. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**. v. 20, n. 1, p.174-180, 2017. Disponível em: https://www.mastereditora.com.br/periodico/20170905_172905.pdf. Acesso em: 02 de março 2024.

BRASIL. Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sistema Único de Saúde. Relatório de recomendação. Canabidiol 200mg/ml para o tratamento de crianças e adolescentes com epilepsia refratária a medicamentos antiepilépticos. **Brasília, (BR): Ministério da Saúde**. 2021. Disponível em: https://www.gov.br/conitec/pt-br/midias/consultas/relatorios/2021/Sociedade/20210602_resoc246_cbd_epilepsia_final.pdf. Acesso em: 07 de março 2024.

BRIGGS, D. E. *et al.* **Brewing Science and practice**. 1º ed. New York: CRC Press. Sep. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1201/9780203024195>

BUENZ, E. J. *et al.* Techniques: Bioprospecting historical herbal texts by hunting for new leads in old tomes. **Trends in Pharmacological Sciences**. v. 25, n. 9, p. 494-498, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tips.2004.07.003>

CARDENAS, R. N. *et al.* Role of Oxidative Stress in Refractory Epilepsy: Evidence in Patients and Experimental Models. **Internacional Journal of Molecular Sciences**. v. 14, p. 1455-1476, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms14011455>

CHEN, Z. *et al.* Treatment outcomes in patients with newly diagnosed epilepsy treated with established and new antiepileptic drugs. A 30-year longitudinal cohort study. **Jama Neurology**. v. 75, n. 3, p. 279-286, 2018. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2017.3949>

COELHO, V. R. **Avaliação do efeito anticonvulsivante e neuroprotetor do ácido rosmarínico e do ácido caféico em camundongos**. Orientadora: Patrícia Pereira. Dissertação (Doutorado em Neurociências – Ciências Biológicas) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/150932>. Acesso em: 11 de abril 2024.

CRAMPON, K. *et al.* Machine-learning methods for ligand–protein molecular docking. **Drug Discovery Today**. v. 27, n. 1, p. 151-164, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.09.007>

CUNHA, A. P. Aspectos históricos sobre plantas medicinais, seus constituintes ativos e fitoterapia. **ESALQ/USP**, 2005.

DIMPFEL, W.; SUTER, A. A. Sleep improving effects of a single dose administration of a valerian/hops fluid extract - a double blind, randomized, placebo-controlled sleep-EEG study in a parallel design using electrohypnograms. **European Journal of Medical Research**. v. 13, n. 5, p. 200-204, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1055/s-2008-1047853>

DUARTE, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Revista MultiCiência**. v. 7, n. 1, p. 1-16, 2006. Disponível em: [file:///C:/Users/fabricia.vieira/Downloads/Atividade%20Antimicrobiana%20de%20Plantas%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/fabricia.vieira/Downloads/Atividade%20Antimicrobiana%20de%20Plantas%20(1).pdf). Acesso em: 07 de junho 2023.

DURELLO, R. S.; SILVA, L. M.; JUNIOR, S. B. Química do Lúpulo. **Química Nova**. v. 42, n. 8, p. 900-919, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170412>

FISCHER, B. **Obtenção e caracterização de óleo essencial e extrato de lúpulo (*Humulus lupulus*) por hidrodestilação e extração com CO₂ subcrítico**. Tese de Doutorado, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim. 2021. Disponível em: https://www.uricer.edu.br/cursos/arq_trabalhos_usuario/4226.pdf. Acesso em: 22 de junho 2023.

FREITAS, R. M. Alterações comportamentais e neuroquímicas durante a fase aguda do processo convulsivo induzido por pilocarpina. **Revista Eletrônica de Farmácia**. v. 5, n. 3, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.5216/ref.v5i3.5373>

GARCIA, E. S. Biodiversidade, Biotecnologia e Saúde. **Cadernos de Saúde Pública**. v. 11, n. 3, p. 491-494, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-311X1995000300024>

GASPARIN, G. P. *et al.* Utilização de plantas medicinais e sua química diversidade e genética. **Brazilian Journal of Development**. v. 8, p. 27678-27690, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.34117/bjdv8n4-321>

GHIT, A. *et al.* GABAA receptors: structure, function, pharmacology, and related disorders. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**. v. 19, n.1, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00224-0>

GOBIRA, P. H. *et al.* Cannabidiol, a Cannabis sativa constituent, inhibits cocaine-induced seizures in mice: Possible role of the mTOR pathway and reduction in glutamate release. **NeuroToxicology**. v. 50, p.116-121, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2015.08.007>

GOODMAN, L; GILMAN, A. **Manual de farmacologia e terapêutica**. 2ª Ed. Porto Alegre: AMGH editora Ltda; 2015.

HEALEY, J. **The Hops List: 265 Beer Hop Varieties from Around the World**. 1º ed., Kindle Edition, 2016.

HOUGHS, J. S. *et al.* **Malting and Brewing Science: Hopped Wort and Beer**. 2° ed, Chapman and Hall: New York, 1982. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1799-3>

KADAN, R. U.; ROY, N. Recent Trends in Drug Likeness Prediction: A Comprehensive Review of In Silico Methods. **Indian Journal of Pharmaceutical Science**. v. 69, n. 5, p. 609-615, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.4103/0250-474X.38464>

KAMINSKI, R. M., ROGAWSKI, M. A., KLITGAARD, H. The potential of antiseizure drugs and agents that act on novel molecular targets as antiepileptogenic treatments. **Neurotherapeutics**. v.11, p. 385–400, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13311-014-0266-1>

KARABÍN, M. *et al.* Biotransformations and biological activities of hop flavonoids. **Biotechnology advances**. v. 33 (6 Pt 2), p. 1063-1090, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.02.009>

KARABÍN, M. *et al.* Biologically Active Compounds from Hops and Prospects for Their Use. **Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.** v.15, n. 3, p. 542–567, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12201>

KAWALSKA, G. *et al.* The hop cones (*Humulus lupulus* L.): Chemical composition, antioxidant properties and molecular docking simulations. **Journal of Herbal Medicine**. v. 33, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2022.100566>

KYROU, I. *et al.* Effects of a hops (*Humulus lupulus* L.) dry extract supplement on self-reported depression, anxiety and stress levels in apparently healthy young adults: a randomized, placebo-controlled, double-blind, crossover pilot study. **Hormones (Athens)**. v. 16, n. 2, p.171-180, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.14310/horm.2002.1738>

LEE, K. M. *et al.* Effects of "Humulus lupulus extract on the central nervous system in mice. **Planta Medica**. v. 59, 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1055/s-2006-959980>

LEV, E. Drugs held and sold by pharmacists of the Jewish community of medieval (11– 14th centuries) Cairo according to lists of materia medica found at the Taylor–Schechter Genizah collection, Cambridge. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 110, n. 2, p. 275–293, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.09.044>

LIU, J. *et al.* Oxidative stress mediates hippocampal neuron death in rats after lithiumpilocarpine-induced status epilepticus. **Seizure**. v. 19, n. 3, p. 165-172, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2010.01.010>

LUSCHER, B.; FUCHS, T.; KILPATRICK, C. L. GABA_A Receptor Trafficking-Mediated Plasticity of Inhibitory Synapses. **Neuron**. v. 70, n. 3, p. 385– 409, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.03.024>

MEDEIROS, M. F. T.; SENNA-VALLE, L. de; ANDREATA, R. H. P. Histórico e o uso da “salsa parrilha” (*Smilax* spp.) pelos boticários no Mosteiro de São Bento. **Revista Brasileira de Biociências**. v. 5, n. S1, p. 27–29, 2007. Disponível em: <https://seer.ufrgs.br/index.php/rbrasbioci/article/view/115799>. Acesso em: 21 de maio 2023.

MEDEIROS, M. F. T. **Etnobotânica histórica: princípios e procedimentos**. Recife: NUPEEA, 2009.

METWALY, A. M. *et al.* Traditional ancient Egyptian medicine: A review. **Saudi Journal of Biological Sciences**. v. 28, n.10, p. 5823-5832, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.06.044>

MOREIRA, S. R. G. Epilepsia: concepção histórica, aspectos conceituais, diagnóstico e tratamento. **Mental**. v. 2, n. 3, p.1-12, 2004. Disponível em: https://pepsic.bvsalud.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-44272004000200009#end. Acesso em: 05 de julho 2023.

NESTLER, E. J.; HYMAN, S. E.; MALENKA, R. C. **Molecular neuropharmacology**. A Foundation for Clinical Neuroscience. 2° ed. New York: McGraw Hill Medical, 2009.

NEVE, R. A. **Hops**, 1° ed., Springer: London, 1991. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-94-011-3106-3_1

PEDLEY, T. A.; BAZIL, C. W.; MORRELL, M. J. **Epilepsia**. In: **M.D., Lewis P. Rowland. Merritt. Tratado de Neurologia**. 10°. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. Cap. 140, p.705-722.

PELT, J. **Especiarias e ervas aromáticas: história, botânica e culinária**. Rio de Janeiro: Jorge Zahar Editor, 2004.

PEREIRA, L. L. *et al.* Tratamentos para epilepsia: uma análise da literatura recente. **Revista Brasileira De Implantodontia e Ciências da Saúde**. v. 6, n. 4, p. 2469–2479, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.36557/2674-8169.2024v6n4p2469-2479>

PERUCCA, E.; WHITE, H. S.; BIALER, M. New GABA-Targeting Therapies for the Treatment of Seizures and Epilepsy: II. Treatments in Clinical Development. **CNS Drugs**. v. 37, n. 9, p. 781-795, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40263-023-01025-4>

PIRES, M. J. P. Aspectos históricos dos recursos genéticos de plantas medicinais. **Rodriguésia**. v. 36, n. 59, p. 61- 66, 1984. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/2175-78601984365906>

RADWAN, M. M. *et al.* “Isolation and Pharmacological Evaluation of Minor Cannabinoids from High-Potency Cannabis sativa.” **Journal of natural products**. v. 78, n. 6, p. 1271-1276, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00065>

RAUPP, D.; SERRANO, A.; MARTINS, T. L. C. A evolução da química computacional e sua contribuição para a educação em Química. **Revista Liberato**. v. 9, n. 12, p. 13–22, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.31514/rliberato.2008v9n12.p13>

RIDDLE, J.M. **Dioscorides on Pharmacy and Medicine**. Austin: University of Texas Press, 1985.

ROCHA, F. A. G. *et al.* O uso terapêutico da flora na história mundial. **Holos**. v. 1, p. 49 – 61 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.15628/holos.2015.2492>

RODRIGUES, M. *et al.* Efeitos do extrato de lúpulo num modelo animal de fibromialgia induzido por reserpina. **Revista Neurociências**. v. 31, p. 1-24, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.34024/rnc.2023.v31.14965>

ROMANO, L. L.; HAZEKAMP, A. Cannabis oil: chemical evaluation of an upcoming cannabis-based medicine. **Cannabinoids**. v. 1, n. 1, p.1–11, 2013. Disponível em: https://bio-creations.com/wp-content/uploads/2024/05/2013-cannabis-oil-chemical-evaluation-of-an-upcoming-cannabis-based-medicine_romano.pdf. Acesso em: 14 de Agosto 2023.

ROSS, S. M. Sleep disorders: a single dose administration of valerian/hops fluid extract (dormeesan) is found to be effective in improving sleep. **Holistic nursing practice**. v. 23, n. 4, p. 253–256, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/HNP.0b013e3181aed09d>

RUDOLPH, U. *et al.* Benzodiazepine actions mediated by specific gamma-aminobutyric acid(A) receptor subtypes. **Nature**. v. 401, p. 796 –800, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/44579>

RUFFOLO, G. *et al.* GABAergic Neurotransmission in Human Tissues Is Modulated by Cannabidiol. **Life (Basel, Switzerland)**. v. 12, n. 12, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/life12122042>

SANTULLI, L. *et al.* The challenges of treating epilepsy with 25 antiepileptic drugs. **Pharmacological research**. v. 107. p. 211-219, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.03.016>

SASAKA, N. *et al.* Long-term oral administration of hop flower extracts mitigates Alzheimer phenotypes in mice. **PLoS One**. v. 9, n. 1, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087185>

SCIENCE OF BEER. **Lúpulo: um olhar químico sobre a planta e sua aplicação na cerveja**. 29 de janeiro 2020. Disponível em: <https://www.scienceofbeer.com.br/br/post/lupulo-um-olhar-quimico-sobre-a-planta-e-sua-aplicacao-na-cerveja-2>. Acesso em: 03 de março 2024.

SCHILLER, H. *et al.* Sedating effects of Humulus lupulus L. extracts. **Phytomedicine**. v. 13, p. 535–541, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2006.05.010>

SHIN, E. J. *et al.* Role of oxidative stress in epileptic seizures. **Neurochemistry International**. v. 59, n. 2, p. 122-137, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2011.03.025>

TANIGUCHI, Y. *et al.* Chemical Characterization of Beer Aging Products Derived from Hard Resin Components in Hops (*Humulus lupulus* L.). **Journal of agricultural and food chemistry**. v. 63, n. 46, p. 10181-10191, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04138>

TYLER, V. E. **The New Honest Herbal. A Sensible Guide to Herbs and Related Remedies**. 2º ed., Stickley Co., Philadelphia, p. 125–126, 1987.

WALKER, T. D. The medicines trade in the Portuguese Atlantic World: acquisition and dissemination of healing knowledge from Brazil (c. 1580-1800). **Social History of Medicine**. v. 26, n. 3, p. 403-431, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/shm/hkt010>

WANNENMACHER, J.; GASTL, M., BECKER, T. Phenolic Substances in Beer: Structural Diversity, Reactive Potential and Relevance for Brewing Process and Beer Quality. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v. 17, n. 4, p. 953-988, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12352>

WATANABE, M. *et al.* GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs. **International Review of Cytology**. v. 213, p. 1-47, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(02\)13011-7](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(02)13011-7)

WEINER, W. J.; GOETZ, C. G. **Neurologia para o Não-Especialista**. 4º ed. São Paulo: Livraria Santos. cap. 8, p. 103-109, 2003.

WHITING, P.J. GABA-A receptor subtypes in the brain: a paradigm for CNS drug discovery?. **Drug Discov Today**. v. 8, n. 10, p. 445-450, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(03\)02703-X](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(03)02703-X)

ZANOLI, P. *et al.* New insight in the neuropharmacological activity of *Humulus lupulus* L. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 102, n. 1, p. 102–106, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.05.040>

ZANOLI, P.; ZAVATTI, M. Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 116, p. 383–396, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.01.011>

ZHU, S. *et al.* Structure of a human synaptic GABA_A receptor. **Nature**. v. 559, p. 67-72, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0255-3>

CAPÍTULO 2

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO DE LÚPULO E AFINIDADE DE SEUS ALFA ÁCIDOS AO RECEPTOR GABA_A: IMPLICAÇÕES NO TRATAMENTO DA EPILEPSIA

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF HOP EXTRACT AND AFFINITY OF ITS ALPHA ACIDS TO THE GABAA RECEPTOR: IMPLICATIONS FOR THE TREATMENT OF EPILEPSY

Fabricia Alves Vieira

Mestranda em Biotecnologia

Instituto de Biotecnologia - Universidade Federal de Uberlândia
Rua Vereador Chico Filgueira, 33 - Sala 319 - Bloco Alfa UNIPAM
Campus Patos de Minas
fabricia.vieira@ufu.br

Júlia Ariana de Sousa Gomes Lenzi

Doutora em Ciências Biológicas

Instituto de Biotecnologia - Universidade Federal de Uberlândia
Rua Vereador Chico Filgueira, 33 - Sala 319 - Bloco Alfa UNIPAM
Campus Patos de Minas
julia.lenzi@ufu.br

Marcos de Sousa Gomes

Doutor em Agroquímica

Instituto de Biotecnologia - Universidade Federal de Uberlândia
Rua Vereador Chico Filgueira, 33 - Sala 319 - Bloco Alfa UNIPAM
Campus Patos de Minas
marcos.gomes@ufu.br

RESUMO: A epilepsia é uma condição neurológica extremamente comum, afetando aproximadamente 50 milhões de pessoas no mundo. Caracteriza-se por episódios recorrentes de crises epiléticas, sendo responsável por um acometimento significativo de morbidade e mortalidade. O tratamento da epilepsia envolve principalmente o uso de fármacos antiepiléticos, que podem ajudar a controlar as crises epiléticas e melhorar a qualidade de vida dos portadores desta patologia. Entretanto, uma parcela importante desse público é refratária aos tratamentos existentes, sendo relevante a realização de estudos que identifiquem novos fármacos com ação antiepilética que sejam seguros e eficazes. Neste sentido, o lúpulo, uma planta da família *Cannabaceae*, conhecido pelo seu uso na fabricação da cerveja, é também utilizado como fitoterápico para o tratamento de ansiedade e distúrbios do sono. Além disso, em ensaios pré-clínicos, já foram demonstrados efeitos do lúpulo sobre outras condições patológicas que acometem o sistema nervoso central, como Alzheimer e depressão. Assim, os objetivos desse trabalho foram obter um extrato de lúpulo, caracterizar a fração de alfa ácidos do extrato através da técnica de Ressonância Magnética Nuclear, avaliar suas atividades antioxidantes *in vitro*, o teor de compostos fenólicos totais e a afinidade de ligação dos mesmos com o receptor GABA_A. Inicialmente, foi preparado o extrato de lúpulo utilizando o solvente hexano, o qual foi analisado através do equipamento de Ressonância Magnética Nuclear. Foi possível identificar três alfa ácidos no extrato, a humulona, cohumulona e adhumulona. O extrato apresentou atividade antioxidante expressiva nos métodos DPPH, de captura do cátion

radical ABTS⁺, fosfomolibdênio e do poder redutor, além de elevado teor dos compostos fenólicos totais. Na análise *in silico*, através da ferramenta de *docking* molecular, foi possível observar a ligação entre os alfa ácidos identificados no extrato e o receptor GABA_A. Destaca-se que a humulona teve o melhor score de ancoragem entre os alfa ácidos avaliados. Conclui-se que o extrato de lúpulo desenvolvido nesse estudo destaca-se por sua importante atividade antioxidante e elevada concentração de alfa ácidos. Além disso, nossos resultados predizem que há ligação dos alfa ácidos ao receptor GABA_A, o que sugere que o lúpulo apresenta grande potencial para ser utilizado no tratamento da epilepsia.

Palavras-chave: Lúpulo; Epilepsia; Estresse oxidativo; *Docking*; Bioinformática.

ABSTRACT: Epilepsy is an extremely common neurological condition, affecting approximately 50 million people worldwide. It is characterized by recurrent episodes of epileptic seizures and is responsible for significant morbidity and mortality. The treatment of epilepsy mainly involves the use of antiepileptic drugs, which can help control epileptic seizures and improve the quality of life of those suffering from the condition. However, a significant proportion of this population is refractory to existing treatments, making it important to carry out studies to identify new drugs with antiepileptic action that are safe and effective. In this sense, hops, a plant from the Cannabaceae family, known for its use in brewing beer, is also used as a herbal medicine to treat anxiety and sleep disorders. In addition, pre-clinical trials have already demonstrated the effects of hops on other pathological conditions affecting the central nervous system, such as Alzheimer's and depression. Therefore, the objectives of this work were to obtain an extract of hops, characterize the alpha-acid fraction of the extract using the Nuclear Magnetic Resonance technique, evaluate its antioxidant activities *in vitro*, the content of total phenolic compounds and their binding affinity with the GABA_A receptor. Initially, the hop extract was prepared using the solvent hexane, which was analyzed using Nuclear Magnetic Resonance equipment. It was possible to identify three alpha acids in the extract, humulone, cohumulone and adhumulone. The extract showed significant antioxidant activity in the DPPH, ABTS⁺ radical cation capture, phosphomolybdenum and reducing power methods, as well as a high content of total phenolic compounds. In the *in silico* analysis, using the molecular *docking* tool, it was possible to observe the link between the alpha acids identified in the extract and the GABA_A receptor. It is noteworthy that humulone had the best *docking* score among the alpha acids evaluated. We conclude that the hop extract developed in this study stands out for its significant antioxidant activity and high concentration of alpha acids. In addition, our results predict that alpha acids bind to the GABA_A receptor, which suggests that hops have great potential for use in the treatment of epilepsy.

Keywords: Hops, Epilepsy, Oxidative stress, *Docking*, Bioinformatics.

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas do Século XX, o uso de plantas medicinais foi reconhecido como recurso terapêutico válido, iniciando-se as discussões sobre a sua incorporação nos sistemas de saúde pública (Gasparin *et al.*, 2022). Dentre a diversidade de plantas medicinais utilizadas com finalidades terapêuticas, destaca-se o lúpulo (espécie *Humulus lupulus* L.), da família *Cannabaceae*, composto por três espécies, *H. lupulus*, *H. japonicus* e *H. yunnanensis*. Dentre

elas, apenas o *H. lupulus* e o *H. japonicus* são cultivadas em larga escala com finalidade comercial (Durello; Silva; Junior, 2019).

O *H. lupulus* tem uma longa história sendo aplicado para vários fins, em especial na indústria cervejeira. A análise de suas características foi inicialmente desvendada por Hayduck em 1888 (Ross, 2009). A partir da segunda metade do século XX, vários estudos fitoquímicos foram realizados para investigar a composição dos cones de lúpulo e outras partes da planta, levando ao isolamento e identificação de compostos farmacologicamente relevantes (Zanoli e Zavatti, 2008).

A resina total do lúpulo pode ser desmembrada em resinas macias e duras. Nas resinas macias, encontra-se uma mistura de alfa ácidos e beta ácidos, humulonas e lupulonas respectivamente, que podem corresponder a 5-21% da massa total do lúpulo em base seca (Karabín *et al.*, 2015). A fração dos alfa ácidos é composta por uma mistura de cinco humulonas análogas, sendo os seus principais constituintes a humulona (35-70% do total de alfa ácidos), a cohumulona (20-55%), a adhumulona (10-15%), a prehumulona (1-10%) e a poshumulona (1-3%) (Karabín *et al.*, 2016).

Em relação aos diversos efeitos biológicos do lúpulo, historicamente há registros de sua atuação sobre o Sistema Nervoso Central (SNC), quando se observou que os trabalhadores experienciavam sonolência durante a sua colheita, aparentemente devido à transferência de resina de lúpulo de suas mãos para a boca (Tyler, 1987). As atividades sedativa e hipnótica do lúpulo têm sido atribuídas à modulação positiva da função do receptor ácido gama-aminobutírico tipo A (GABA_A) observada tanto com extratos de lúpulo (Aoshima *et al.*, 2006) quanto com frações de alfa ácidos (Benkherouf *et al.*, 2020).

Assim, desperta-se a perspectiva do seu uso no tratamento da epilepsia. Essa condição caracteriza-se por crises epiléticas recorrentes espontâneas, que podem ser definidas como manifestações clínicas resultantes de descargas neuronais anormais, produzindo uma superexcitação dos neurônios, podendo ocorrer também através do desequilíbrio entre os mecanismos de neurotransmissão inibitórios e excitatórios (Nestler; Hyman; Malenka, 2009). O neurotransmissor inibitório GABA desempenha um papel importante na modulação da excitabilidade neuronal, e uma alteração na transmissão GABAérgica está relacionada à patogênese de alguns distúrbios que dão origem as crises epiléticas (Perrucci; White; Bialer, 2023).

Outro fator relativo à fisiopatogênese da epilepsia que tem recebido grande atenção da comunidade científica nos últimos anos é o estresse oxidativo. Essa hipótese tem se confirmado em estudos experimentais humanos e animais (Rosa, 2020). Estudos demonstram, ainda, que o

processo de hiperexcitação neuronal desencadeado na epilepsia favorece o estresse oxidativo, podendo estar envolvido na progressão da doença (Liu *et al.*, 2010; Tchekalarova *et al.*, 2018).

O tratamento da epilepsia é realizado, principalmente, pelo uso de medicamentos antiepilépticos. No início do século 20, a descoberta do fenobarbital tornou-se o marco na história moderna (Santulli *et al.*, 2016). Na década de 1960, houve a inclusão dos benzodiazepínicos, os quais são sedativos e produzem dependência física e psicológica, levando a sintomas de abstinência significativos na interrupção do tratamento (Dubovsky e Marshall, 2022).

Recentemente, a *Cannabis*, antes considerada como altamente perigosa e dotada de efeitos nocivos excedentes aos eventuais benefícios terapêuticos, experenciou uma reviravolta sobre sua aplicabilidade. O canabidiol (CBD), um diversos compostos presente na planta têm sido analisado e empregado como terapia complementar em pacientes afetados por epilepsia grave resistente a medicamentos. No entanto, sua recomendação é muito limitada, devido aos efeitos psicotrópicos que ela manifesta (Romano e Hazekamp, 2013; Radwan *et al.*, 2015).

Nesse contexto, há necessidade do desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da epilepsia, que detenham os efeitos benéficos de um perfil antiepiléptico, deixando, entretanto, de ser sedativo, atáxico ou passível de dependência (Nestler; Hyman; Malenka, 2009). A potencialização da neurotransmissão GABAérgica, bem como a tentativa de reduzir o estresse oxidativo, usando novas abordagens está entre as estratégias para desenvolver melhores tratamentos para a epilepsia (Rosa, 2023).

Partindo dessa premissa, considerando o pressuposto dos efeitos já conhecidos do lúpulo no SNC e sua provável ação sobre o sistema GABAérgico, e seu potencial antioxidante, o presente trabalho visa avaliar a atividade antioxidante do extrato de lúpulo e investigar a ligação dos alfa ácidos contidos no extrato aos receptores GABA_A.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Aquisição da amostra para a realização das análises

A amostra de lúpulo foi adquirida de um estabelecimento especializado na comercialização de produtos para a fabricação de cerveja. A variedade utilizada foi Barth Haas Sabro, safra 2021, que se apresentava na forma de pellets e teor de alfa ácidos de 14,3%.

2.2. Preparo do extrato de lúpulo

O extrato de lúpulo foi obtido em colaboração com o laboratório de Química Tecnológica da Universidade Federal de Uberlândia – Campus Patos de Minas. Para a preparação do extrato, utilizou-se 500 g de pellets de lúpulo, os quais foram embebidos em 500 mL de solvente (hexano) e, em seguida, deixados por 7 dias na temperatura de 25°C. O extrato foi filtrado por meio de algodão e, posteriormente, o solvente foi evaporado utilizando um evaporador rotativo a vácuo (marca Fisatom e modelo 802 - 40°C; 130 mbar; 30 min). Após esse procedimento, o extrato foi armazenado em ultra freezer a uma temperatura de -80°C e, depois de 24 horas, colocado em liofilizador (marca Liotop e modelo L101) por um período de 72 horas. O extrato seco resultante foi, então, armazenado a temperatura ambiente em um dessecador antes da análise.

2.3 Procedimento de Análise

2.3.1 Análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN ^{13}C)

O extrato de lúpulo foi analisado por RMN ^{13}C (100 MHz) em um equipamento marca BRUKER no modelo Ascend 400. A análise foi realizada utilizando uma solução contendo 90 mg de extrato de lúpulo e 0,6 mL de clorofórmio deuterado (Marca MagniSolve).

2.4 Análise da atividade antioxidante

2.4.1 Avaliação da atividade antioxidante por meio do método de captura do radical DPPH

A avaliação da atividade antioxidante, por meio do método do sequestro dos radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), foi realizada de acordo com as metodologias de Lopes-Lutz e colaboradores (2008), seguidas de pequenas modificações. Uma solução etanólica de DPPH foi preparada na concentração de 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Para a avaliação, 2,7 mL da solução de DPPH foi adicionada em tubos de ensaio, seguido da adição de 0,3 mL das concentrações do extrato de lúpulo (1000, 500, 250, 125, 62,5 e 31,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Em paralelo, o controle negativo foi preparado contendo todos os reagentes, exceto o extrato.

Após 60 minutos, leituras foram realizadas utilizando o espectrofotômetro no comprimento de onda de 517 nm. A atividade antioxidante (AA%) foi calculada usando a seguinte equação:

$$AA\% = [(ACN - AA_{mo}) / ACN] * 100$$

Em que:

AA_{mo} = Absorbância do DPPH com a amostra.

ACN = Absorbância do DPPH com o etanol.

2.4.2 Avaliação da atividade antioxidante utilizando o método de captura do cátion radical ABTS⁺

A formação do cátion radical ABTS ((2,2-azinobis- [3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico]) foi realizada de acordo com Antunes e colaboradores (2010). Para o ensaio, foram misturados 10 µL do extrato de lúpulo nas concentrações (1000, 500, 250, 125, 62,5 e 31,25 µg mL⁻¹) e 990 µL da solução do radical ABTS^{•+}. A absorbância foi monitorada espectrofotometricamente a 735 nm durante 6 min. A absorção de uma amostra contendo a mesma quantidade de etanol e uma solução do radical ABTS^{•+} atuou como controle negativo. A porcentagem de inibição do radical ABTS^{•+} (AA%) pela amostra foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$AA\% = [(ACN - AA_{am}) / ACN] * 100$$

Em que:

ACN = Absorbância do controle negativo

AA_{am} = Absorbância da amostra

2.4.3 Método de redução do Complexo de Fosfomolibdênio

O método do fosfomolibdênio foi realizado conforme Prieto; Pineda; Aguilar (1999). Uma alíquota de 0,1 mL do extrato de lúpulo nas concentrações (1000, 500, 250, 125, 62,5 e 31,25 µg mL⁻¹) foi adicionada em um tubo de ensaio contendo 1,0 mL de solução dos reagentes (ácido sulfúrico 0,6M; fosfato de sódio 28mM e molibdato de amônio 4mM). Os tubos foram

tampados e incubados em banho-maria a 95°C por 60 min. Após o resfriamento dos tubos de ensaio, realizou-se a leitura no espectrofotômetro a 695 nm. Os valores foram comparados com uma curva de várias concentrações do antioxidante sintético BHT (Butilhidroxitolueno) (2000; 1000; 500; 250; 125 e 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Os resultados também foram expressos em miligramas de equivalente de BHT por grama de extrato (mg EBHTg^{-1}).

A redução do complexo fosfomolibdênio é dependente da ação dos antioxidantes para a formação do cromógeno verde, portanto, os valores de absorbância podem ser utilizados para medir a atividade antioxidante. Sendo assim, quanto maior a atividade antioxidante do extrato, maior é a absorbância apresentada por ele (Prieto; Pineda; Aguilar, 1999).

2.4.4 Método do poder redutor

A avaliação da atividade antioxidante por meio do método do poder redutor foi realizada de acordo com a metodologia de Oyaizu (1986). Foi utilizado 100 μL do extrato de lúpulo nas concentrações (1000, 500, 250, 125, 62,5 e 31,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$) que foram misturados com 1 mL de tampão fosfato 0,2 M pH 6,0 e 1 mL de solução aquosa de ferricianeto de potássio 1%. Após 20 minutos de incubação a 50°C, 1 mL de ácido tricloroacético 10% foi adicionado à mistura, sendo essa agitada em vórtex. Em seguida, 3 mL de água destilada foi adicionada e 600 μL cloreto férrico 0,1%. Leituras foram realizadas utilizando o espectrofotômetro no comprimento de onda de 700 nm. Os valores foram comparados com uma curva de várias concentrações do antioxidante sintético BHT (Butilhidroxitolueno) (1000; 500; 250; 125 e 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Os resultados também foram expressos em miligramas de equivalente de BHT por grama de extrato (mg EBHTg^{-1}).

2.4.5. Determinação do teor dos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos foi determinado por meio do reagente Folin-Ciocalteu de acordo com o procedimento descrito por Singleton e Rossi (1965). Reagiu-se 0,50 mL do extrato de lúpulo com 2,5 mL de 0,2 mol L^{-1} do reagente Folin-Ciocalteu. Posteriormente, 2 mL de solução saturada de carbonato de sódio (75 g L^{-1}) foi adicionado à mistura reacional. As leituras de absorbância foram realizadas a 760 nm após incubação à temperatura ambiente durante 2 h. O ácido gálico (15,625; 31,25; 62,5; 125; 250; 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) foi utilizado como padrão de referência e os resultados foram expressos em miligramas de equivalente de ácido gálico (mg GAE) por grama do extrato de lúpulo. Todos os testes foram realizados em triplicata.

2.5 Análise Estatística

Para a avaliação dos dados dos testes antioxidantes DPPH, ABTS, Complexo de Fosfomolibdênio, Poder Redutor e Teor de Compostos Fenólicos Totais, os experimentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado (DIC), nas seis concentrações (1000, 500, 250, 125, 62,5 e 31,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$), com 3 repetições. O programa estatístico utilizado foi o Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados - Sisvar (Ferreira, 2011), sendo os dados submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. Os resultados foram plotados em gráficos de barras com os valores de porcentagem antioxidante em relação às concentrações analisadas (DPPH e ABTS) e absorbância (Complexo de Fosfomolibdênio e Poder Redutor). Já para o teste do teor de fenólicos totais os resultados foram plotados em gráficos de barras com os valores equivalentes ao ácido gálico, expressos em miligramas de ácido gálico (mg GAE) por grama do extrato do lúpulo. O software empregado foi o GraphPad Prism versão 5.01.

2.6 Estudo Computacional

Após identificação dos alfa ácidos existentes no extrato pelo método de RMN, foi aplicado o método *in silico*, um estudo computacional através da ferramenta de *docking*. Todas as abordagens computacionais foram efetuadas no software MOE - Molecular Operating Environment, ChemComp, 2022.02v. Especificações do sistema: Processador AMD Ryzen 9, 5900X 12-Core, 3,70 GHz, 128 GB (utilizável: 128 GB) de memória RAM, 64-bit, em ambiente Windows. Estas descrições são compatíveis com o mínimo exigido pelo software.

A aplicação das ferramentas *in silico* foi utilizada com um viés de comparação com o composto natural CBD, utilizado no manejo de crises epiléticas. No primeiro cenário, o CBD foi usado como estrutura modelo e foi submetido ao *docking*. No total, utilizamos quatro ligantes no *docking*: os três alfa ácidos isolados no extrato (humulona, cohumulona e adhumulona), além do modelo de comparação - o CBD.

Todas essas estruturas foram obtidas na base de dados PubChem (Kim *et al.*, 2023), com os CIDs 442911, 196915, 44566583 e 644019, respectivamente. Quanto aos receptores, simulou-se a ligação do ligante com a estrutura 6X3Z, a configuração eletrônica prevista para o subtipo $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ do receptor GABA_A humano. As estruturas foram adquiridas por meio do Protein Data Bank (RCSB.org) (Burley *et al.*, 2023).

2.6.1 Preparação dos receptores

As estruturas dos alfa ácidos foram importadas para o ambiente MOE e, em seguida, utilizou-se a ferramenta Quickprep, um recurso automatizado que ajusta a estrutura por meio da correção de átomos distantes, da adição de átomos de hidrogênio ausentes, da inclusão de ligações no centro ativo, da protonação e da definição da configuração de menor energia potencial.

Em seguida, o SiteFinder foi aplicado à estrutura ajustada, sendo uma ferramenta que identifica a sequência no receptor que se postula como a mais adequada para receber o sítio ativo. Por fim, essa sequência foi isolada na forma de Dummies, onde a simulação de *docking* ocorreu apenas nesse sítio.

2.6.2 Docking

A estrutura 6X3Z foi submetida ao *docking* com cada um dos ligantes. Considerando-se os alfa ácidos, as três estruturas foram sujeitas ao *docking* simultaneamente. Em seguida, a estrutura ligante do CBD. Os parâmetros de *docking* do MOE não foram alterados, mantendo-se o triangle matcher para a geração de poses, seguindo a função de pontuação London dG com 5 poses. As melhores conformações de cada ligante foram selecionadas de acordo com o resultado final de S, pontuação que classifica os melhores resultados.

2.6.3 Visualização de interações

Para uma melhor compreensão e visualização dos resultados de *docking*, foi gerado um mapa de interações para cada ligante, o que facilita a identificação dos resíduos de aminoácidos que interagem com cada ligante e o tipo de interação. Estes mapas foram gerados pelo Ligands Interactions, um recurso do MOE.

2.6.4 Análises farmacocinéticas

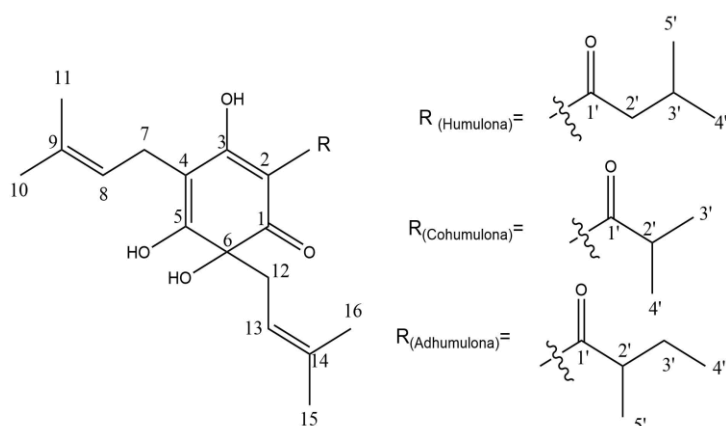
A ADMET é um método importante para avaliar as propriedades farmacocinéticas de uma molécula. Esta análise baseia-se na absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade, e pode ser utilizada para prever a eficácia e a segurança das estruturas. Para tal, utilizamos a sequência SMILE dos alfa ácidos na ferramenta SwissADME (Daina *et al.*, 2017).

3 RESULTADOS

3.1 Identificação dos alfa ácidos no extrato de lúpulo

O extrato de lúpulo apresentou em sua composição química os seguintes alfa ácidos: humulona, cohumulona e adhumulona (Figura 1).

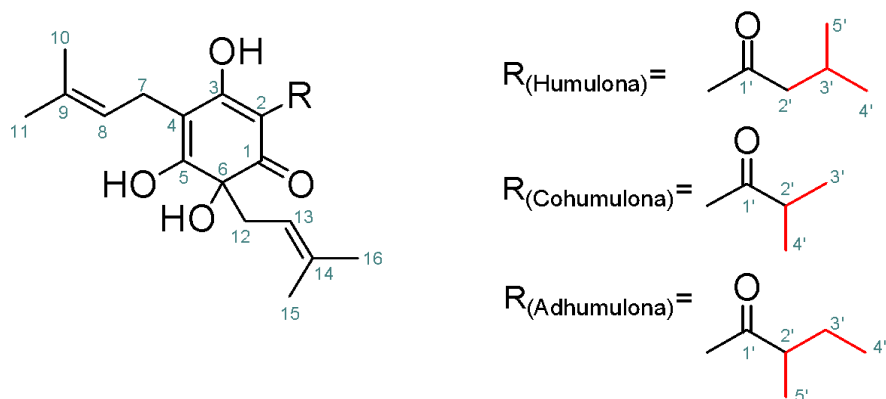
Figura 1 - Estrutura dos alfa ácidos identificados no extrato de lúpulo.



Fonte: Elaboração própria.

Os alfa ácidos identificados no extrato de lúpulo se diferenciam de acordo com a cadeia lateral da posição 2 do anel. O substituinte da carbonila (destacado em vermelho na Figura 2) pode ser *terc*-butil resultando na humulona, isopropil resultando na cohumulona, ou 2-butil resultando na adhumulona.

Figura 2 - Diferença entre a estrutura dos alfa ácidos identificados no extrato de lúpulo.



Fonte: Elaboração própria.

Através dos deslocamentos químicos desses carbonos no RMN ^{13}C foi possível comparar ao que se já tem na literatura (Hoek; Hermans-Lokkerbol; Verpoorte, 2001) e realizar a identificação desses alfa ácidos, como pode ser verificado na Tabela 1. Os espectros de RMN ^{13}C se encontram no Apêndice.

Tabela 1 - Dados de RMN ^{13}C dos alfa ácidos comparados com a literatura.

Análogos	Carbono	Deslocamento RMN ^{13}C (ppm) Amostra	Deslocamento RMN ^{13}C (ppm) - Referência (Hoek; Hermans-Lokkerbol; Verpoorte, 2001)
Humulona	1'	200,43	200,77
	2'	46,64	46,79
	3'	26,02	26,19
	4'	22,86	22,87
	5'	22,65	22,65
Adhumulona	1'	204,32	204,90
	2'	40,85	40,80
	3'	26,44	27,20
	4'	11,70	11,51
	5'	16,01	15,82
Cohumulona	1'	205,32	205,34
	2'	34,75	34,95
	3'	18,55	18,97
	4'	17,90	18,00

Fonte: Elaboração própria.

3.2. Atividade antioxidante do extrato de lúpulo

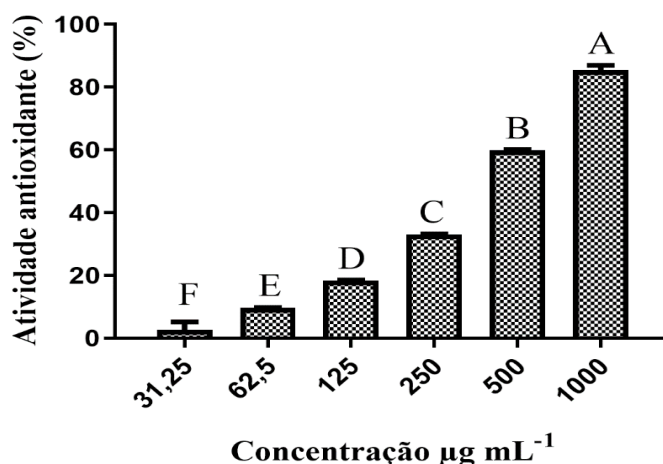
Os métodos DPPH e ABTS foram empregados para determinar a capacidade de sequestro de radicais livres de compostos do extrato de lúpulo, enquanto a avaliação dos teores de compostos fenólicos totais foi demonstrada pela análise de compostos fenólicos. Além disso, o ensaio do Complexo Fosfomolibdênio e do Poder Redutor foram utilizados para avaliar a capacidade antioxidante por meio de reações de oxi-redução.

3.2.2 Atividade antioxidante do extrato do Lúpulo pelo método de DPPH.

Os resultados obtidos da atividade antioxidante por meio do método DPPH é demonstrada pela capacidade do extrato de lúpulo em neutralizar o radical DPPH. A seguir, na Figura 3, estão apresentados os valores das porcentagens antioxidantes atingidas de acordo com as concentrações utilizadas.

Figura 3 - Atividade antioxidante do extrato do Lúpulo pelo método de DPPH.

Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas para comparar as concentrações do extrato, não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.



Fonte: Elaboração própria.

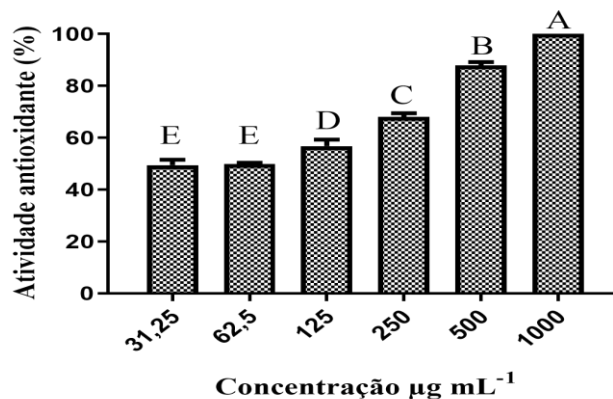
O maior valor foi obtido na concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, enquanto o menor valor foi apresentado na concentração de $31,25 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os resultados demonstram uma relação concentração-dependente de atividade antioxidante entre as diferentes faixas de concentração.

3.2.3 Atividade antioxidante do extrato do Lúpulo pelo método de ABTS.

A atividade antioxidante medida pelo método ABTS permite uma avaliação da eficácia do extrato de lúpulo em neutralizar radicais livres. Os resultados obtidos da atividade antioxidante por esse método, avaliou a capacidade do extrato de neutralizar os radicais livres ABTS nas distintas concentrações expressas na Figura 4.

Figura 4 - Atividade antioxidante do extrato do Lúpulo pelo método de ABTS.

Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas para comparar as concentrações do extrato, não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.



Fonte: Elaboração própria.

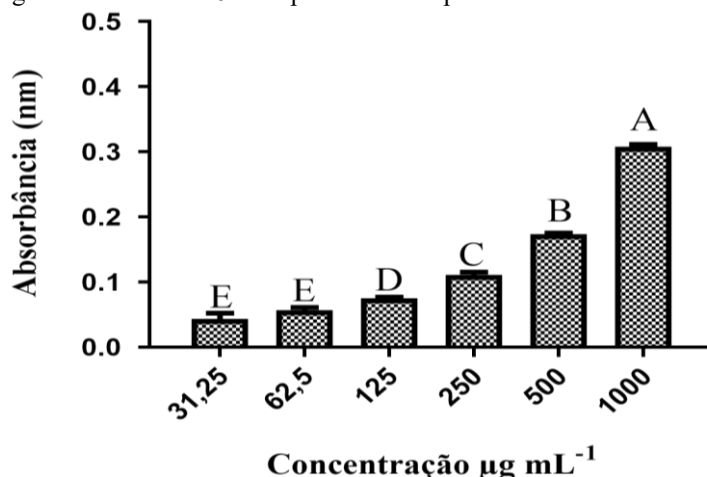
Os valores obtidos demonstram ter alcançado 100% de atividade antioxidante a partir da concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Observa-se, ainda, um valor mais significativo da atividade antioxidante, em relação à menor concentração (49%), comparado ao método DPPH (2,6%).

3.2.4 Atividade antioxidante do extrato do Lúpulo pelo método do Poder Redutor

Os valores de absorbância referentes às diferentes concentrações do extrato de lúpulo, obtido pela metodologia do poder redutor, estão dispostas no gráfico relativo à figura 5. Nota-se que a diferença de concentração permanece concentração-dependente, ou seja, quanto maior a concentração, maior a atividade antioxidante.

Figura 5 - Atividade antioxidante do extrato do Lúpulo pelo método do Poder Redutor.

Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas para comparar as concentrações do extrato, não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.



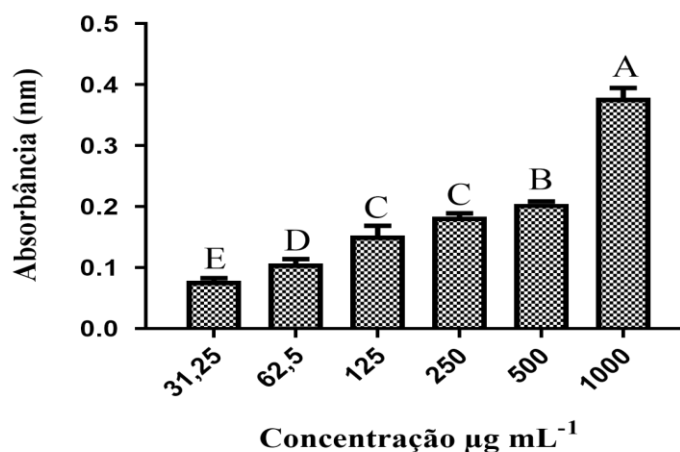
Fonte: Elaboração própria.

Entre as concentrações de $31,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, não foi notada diferença estatística significativa, porém, foram inferiores em relação às de concentração de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$, $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ e de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, sendo notório um aumento da absorbância conforme a concentração aumenta.

3.2.5 Atividade antioxidante do extrato do Lúpulo pelo método do Complexo Fosfomolibdênio.

Os resultados ilustrados na Figura 6 reforçam que, quanto maior a atividade antioxidante do extrato, maior é a absorbância apresentada por ele.

Figura 6 - Atividade antioxidante do extrato do Lúpulo pelo método do Complexo Fosfomolibdênio. Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas para comparar as concentrações do extrato, não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.



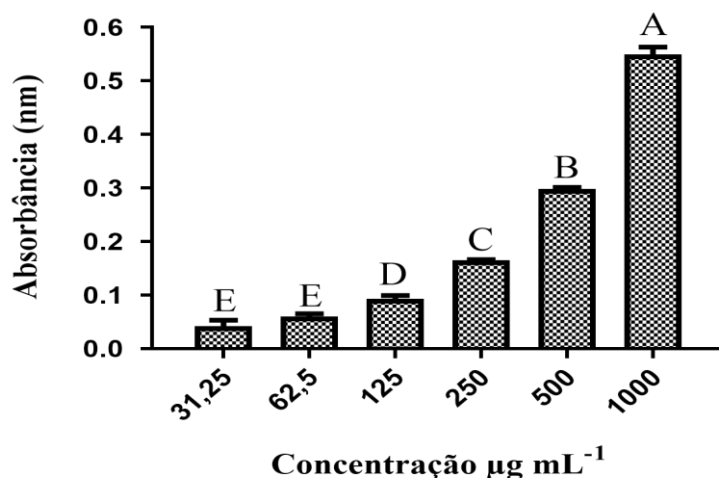
Fonte: Elaboração própria.

Observa-se que a atividade antioxidante foi maior nas concentrações mais altas e diminuiu consideravelmente nas concentrações mais baixas, evidenciando atividade antioxidante relevante na concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os valores obtidos por esse método apresentaram atividade antioxidante superior aos resultados alcançados no método do poder redutor.

3.2.6 Teor dos compostos Fenólicos do extrato do Lúpulo pelo método do Folin Cicateau e valores das atividades antioxidantes equivalentes ao padrão antioxidante BHT.

Outro teste realizado para avaliar a atividade antioxidante e a quantificação de compostos fenólicos totais foi a metodologia que utiliza o reagente Folin Cicateau. Trata-se de um método que determina a concentração total de compostos fenólicos, e estes são conhecidos por seu potencial antioxidante. Os resultados obtidos estão dispostos na Figura 7.

Figura 7 – Teor dos compostos Fenólicos do extrato do Lúpulo pelo método do Folin Cicateau e valores das atividades antioxidantes equivalentes ao padrão antioxidante BHT. Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas para comparar as concentrações do extrato, não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.



Fonte: Elaboração própria.

A atividade antioxidante permaneceu superior na concentração de 1000 µg mL⁻¹ e diminuiu consideravelmente a partir da concentração de 500 µg mL⁻¹. Nota-se aumento progressivo da absorbância comparando todas as concentrações, sendo mais expressivo entre as duas maiores concentrações.

3.2.7 Teor de compostos fenólicos totais

Na tabela 2, estão expostos os resultados da atividade antioxidante em mg EBHT g⁻¹ do método Complexo Fosfomolibdênio e do Poder Redutor e também a avaliação do teor de compostos fenólicos totais em relação ao padrão ácido gálico (mg EAG g⁻¹).

Tabela 2. Valores do teor de compostos fenólicos totais (mg equivalente do ácido gálico por g do extrato de Lúpulo).

	Compostos Fenólicos	Poder Redutor	Complexo Fosfomolibdênio
	mg EAG g ⁻¹	mg EBHT g ⁻¹	mg EBHT g ⁻¹
Extrato do Lúpulo	155,7 ± 0,10	94,3 ± 0,05	120,0 ± 0,01

Fonte: Elaboração própria.

Os valores obtidos demonstram o teor de compostos fenólicos totais em relação ao padrão ácido gálico pelo método do Complexo Fosfomolibdênio e Poder Redutor, reforçando a capacidade antioxidante do extrato de lúpulo analisado.

3.3 Estudo Computacional

Conhecendo sobre os alfa ácidos presentes no extrato, avaliou-se, através do método *in silico*, a capacidade dessas moléculas se ligarem ao receptor GABA_A. Essa ferramenta propôs a ação de cada uma das moléculas em seu alvo de proteína em termos moleculares precisos.

3.3.1 Predição de sítio de ligação

Em geral, o melhor sítio ativo de ligação predito pelo SiteFinder é o de maior sequência de aminoácidos. No receptor em estudo, 6X3Z, selecionou-se o melhor resultado entre 133 opções sugeridas pelo MOE. A primeira tem 313 aminoácidos em sua composição. A Figura 8a ilustra a superfície do sítio de ligação selecionado, tendo em vista toda a estrutura do receptor, enquanto a Figura 8b foca no modelo Dummie criado com o sítio de ligação isolado.

Figura 8a: Estrutura do receptor GABAA, subunidade $\alpha 1\beta 2\gamma 2$, PDB ID-6X3Z.

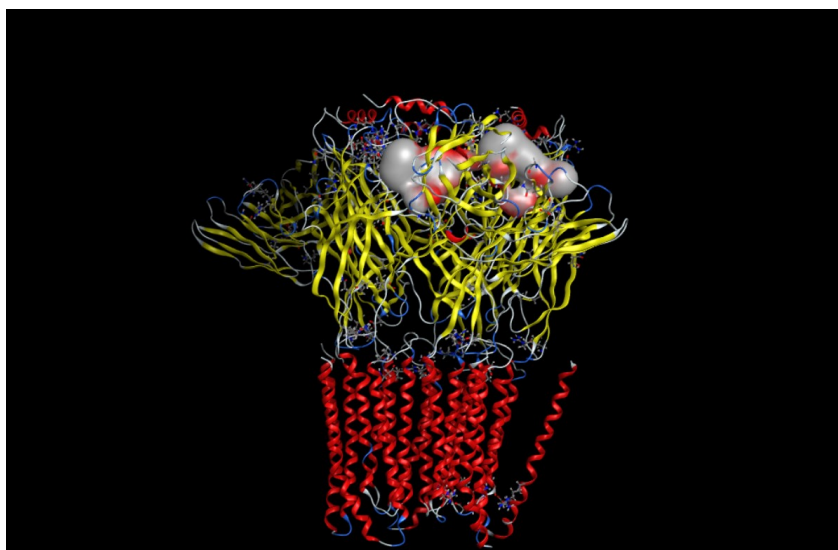


Figura 8a: A superfície destacada em tons de branco e cinza é a representação do sítio de ligação predito pela ferramenta SiteFinder, em um contraste com a subunidade do receptor como um todo.

Figura 8b: Estrutura isolada do sítio de ligação predito.

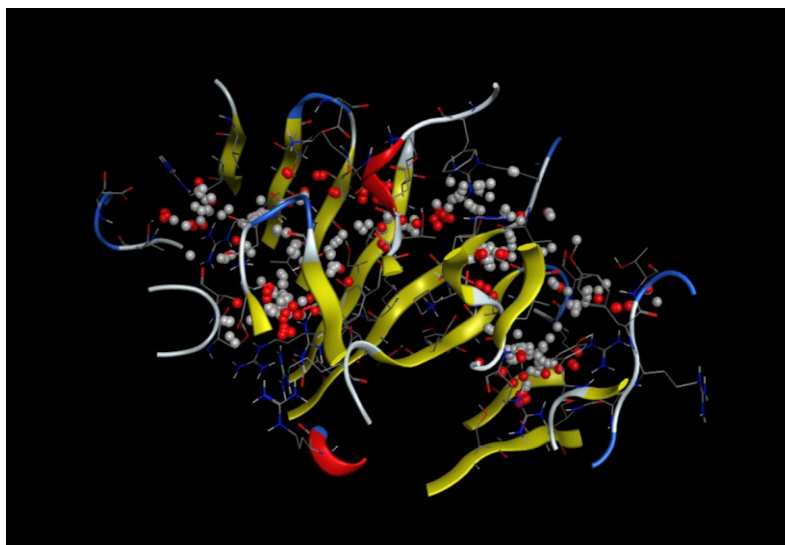


Figura 8b: As esferas em cinza e vermelho é a representação da sequência do mesmo gerada pelo SiteFinder e isolada através da criação de dummies.

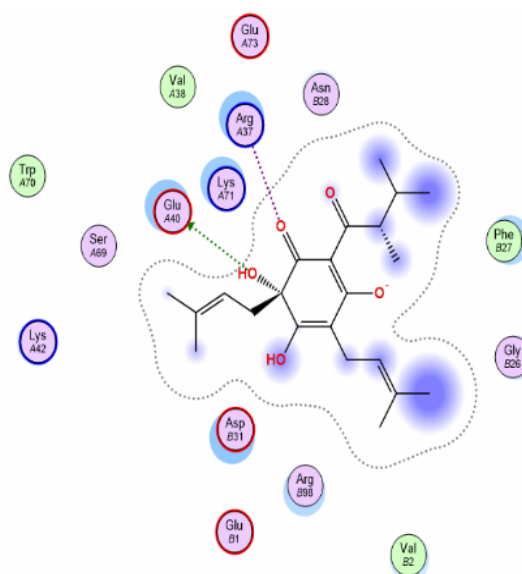
3.3.2 *Docking* molecular

O processo de *docking* foi realizado simultaneamente com a biblioteca dos três alfa ácidos isolados no extrato. Esse mesmo receptor também foi previamente identificado como alvo de ligantes no CBD (Ruffolo *et al.*, 2022). Por meio de uma busca no RCSB-PDB, localizamos com sucesso a estrutura isolada desse receptor, o que nos possibilitou seguir com as demais análises.

Os resultados da análise de *docking* são selecionados com base na pontuação S. Os scores selecionados foram (S score -6,4629) para adhumulona, (S score -7,1442) para humulona e (S score -6,6922) para cohumulona. Observa-se a partir desses resultados que a humulona teve o melhor score entre os alfa ácidos avaliados.

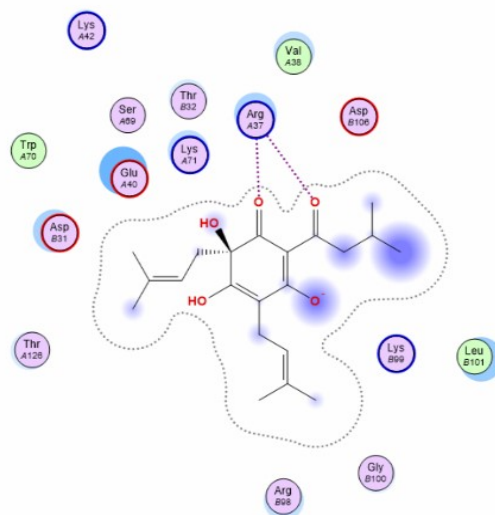
As estruturas resultantes foram exportadas para o MOE para análise, com o objetivo de elucidar a forma como estes compostos interagem com o receptor e as regiões específicas envolvidas. As conformações dos alfas ácidos podem ser observadas individualmente, assim como as interações do ligante ao nível dos aminoácidos entre eles e o receptor (ver Adhumulona na Fig. 9a, humulona em 9b, e cohumulona em 9c).

Figura 9a: Representação do mapa de interações da adhumulona, destacando-se os aminoácidos do receptor que fazem contato direto com o ligante.



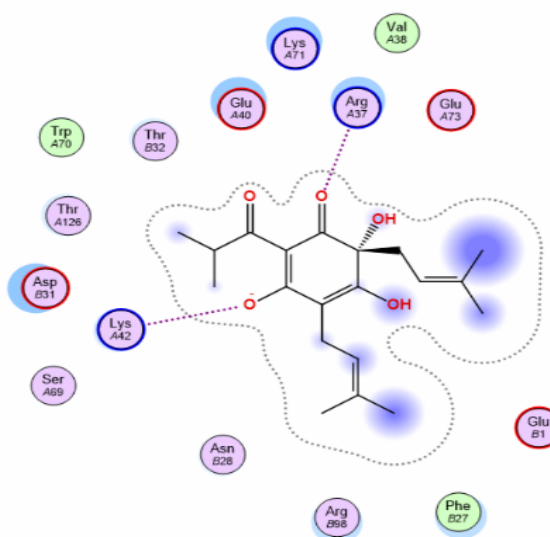
Fonte: Elaboração própria.

Figura 9b: Representação do mapa de interações da humulona, destacando-se os aminoácidos do receptor que fazem contato direto com o ligante.



Fonte: Elaboração própria.

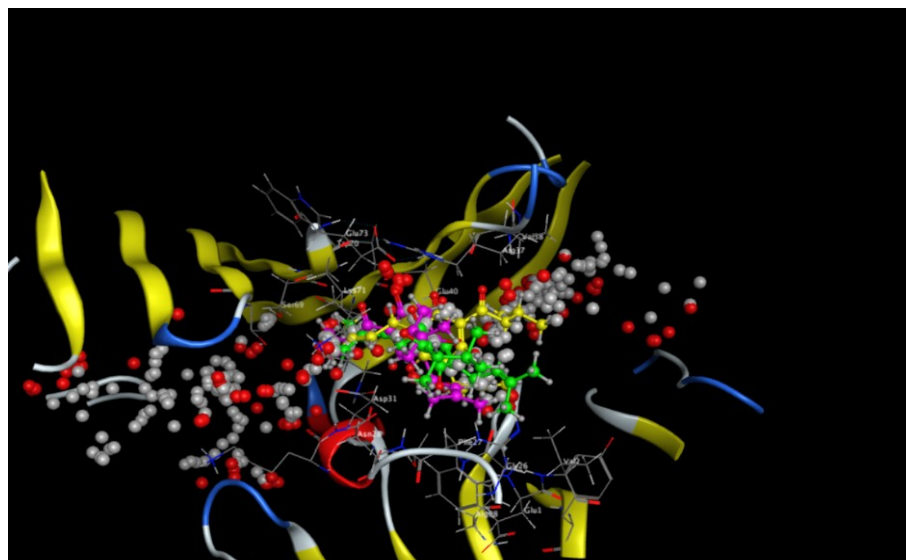
Figura 9c: Representação do mapa de interações da cohumulona, destacando-se os aminoácidos do receptor que fazem contato direto com o ligante.



Fonte: Elaboração própria.

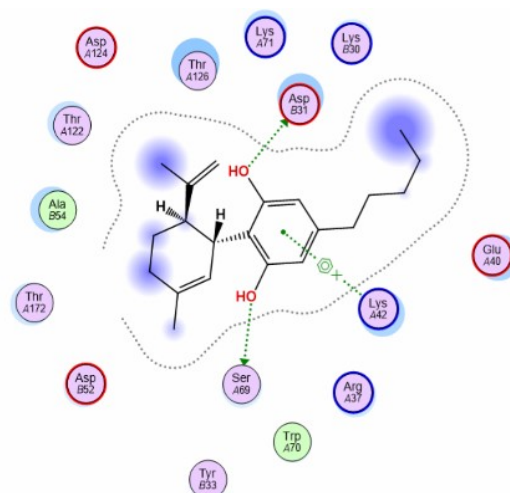
O resíduo Arg37 desempenha um papel significativo no processo de *docking* ligante-receptor, formando uma interação de contacto metal/íon com os três ligantes (ver a legenda das interações na Fig. 14). Na humulona, este é o único tipo de interação observado, ao passo que a adhumulona forma uma ligação H-doador com o resíduo Glu40 e a cohumulona estabelece uma ligação metal/íon com o resíduo Lys42. Por outra perspectiva, é possível destacar no *docking* das três estruturas o quanto elas estão próximas fisicamente no sítio de ligação (Fig. 10).

Figura 10: *Docking* molecular. Estrutura dos três alfa ácidos ancorados, concomitantemente ao dummie do receptor. Estrutura em amarelo é referente à adhumulona, estrutura em verde se refere à humulona, e a estrutura em rosa diz respeito à cohumulona.



Para o CBD, aplicamos a mesma metodologia, com o interesse de verificar se as interações com o receptor seguem o modelo demonstrado nos alfa ácidos. A melhor posição entre as cinco posições geradas pelo *docking* foi selecionada para esta análise. No que diz respeito às interações, salienta-se o resíduo 42 de lisina, que aparece como uma interação pi-H com o ligante CBD (Fig. 11), e que foi previamente identificada na cohumulona.

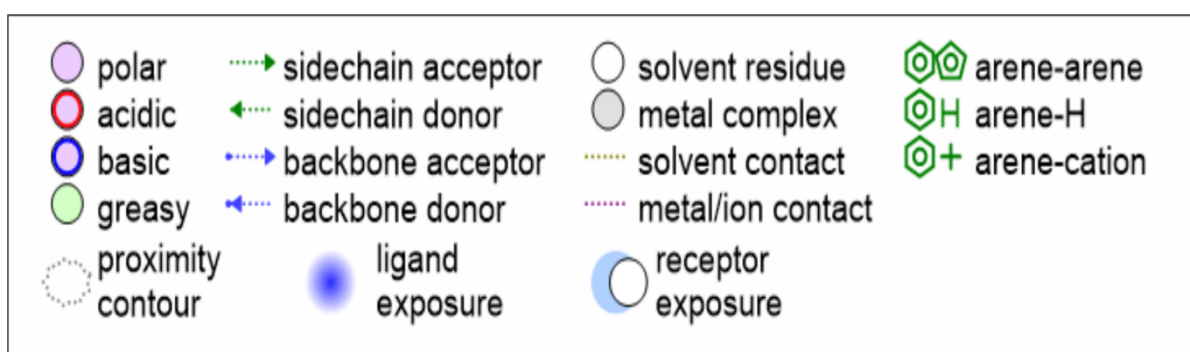
Figura 11: Representação do mapa de interações da cohumulona, destacando-se os aminoácidos do receptor que fazem contato direto com o ligante.



Fonte: Elaboração própria.

A vizinhança dos aminoácidos que envolvem o CBD com o ligante é muito semelhante aos resíduos que também circundam os alfa ácidos, estando claramente ancorado numa posição semelhante à dos alfa ácidos. Além disso, os resíduos Ser69 e Asp31 são de interesse, uma vez que parecem formar ligações doadoras de H entre si no mapa de interações do CBD e na proximidade dos alfa ácidos. Esses resultados reforçam a variedade de moduladores alostéricos positivos que atuam nos receptores GABA_A, com propriedades semelhantes aos ligantes avaliados.

Figura 12: Legenda representativa do mapa de interações apresentado nas figuras 9a, 9b, 9c e 12.



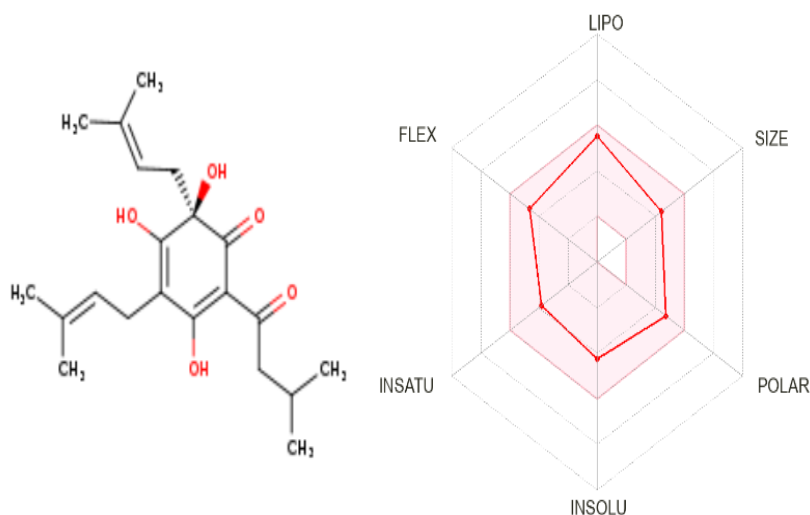
Fonte: Elaboração própria.

3.3.3 Análise da toxicidade dos alfa ácidos

A análise de similaridade com o fármaco foi utilizada para avaliar as propriedades ADME (absorção, distribuição, metabolismo e excreção). Uma molécula é considerada ativa por via oral se cumprir as cinco regras de Lipinski, permitindo no máximo duas violações (Lipinski *et al.*, 2012). Essas regras indicam que o peso molecular (MW) não deve ultrapassar 500 g/mol, o número de aceptores de ligações de hidrogênio deve ser no máximo 10, o de doadores de ligações de hidrogênio deve ser até 5, o valor de LogP deve ser inferior a 5, e o número de ligações rotativas deve ser de no máximo 10.

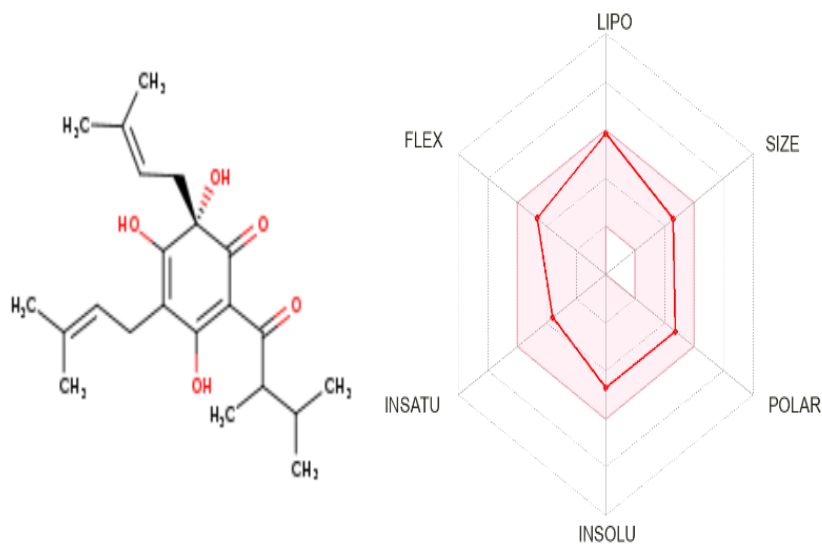
A ferramenta SwissADME revelou que os três alfa ácidos apresentam potencial promissor como ativos orais, sem violações às regras de Lipinski (Tabela 3, Fig. 14a, 14b e 14c). Após a análise de similaridade com o fármaco, todos os parâmetros avaliados pelo SwissADME mostraram-se favoráveis, sem violações nas regras de Ghose, Veber, Egan e Muegge, além de uma pontuação de biodisponibilidade consistente de 0,56. Ademais, não foram observados alertas para PAINS (compostos de interferência em ensaios de triagem).

Figura 13a: Radar de biodisponibilidade predito pela ferramenta SwissADME. À esquerda temos a estrutura do alfa ácido (humulona) e à direita o radar, em que as áreas em rosa representam cada propriedade, destacando-se lipofilicidade, peso molecular, solubilidade e flexibilidade.



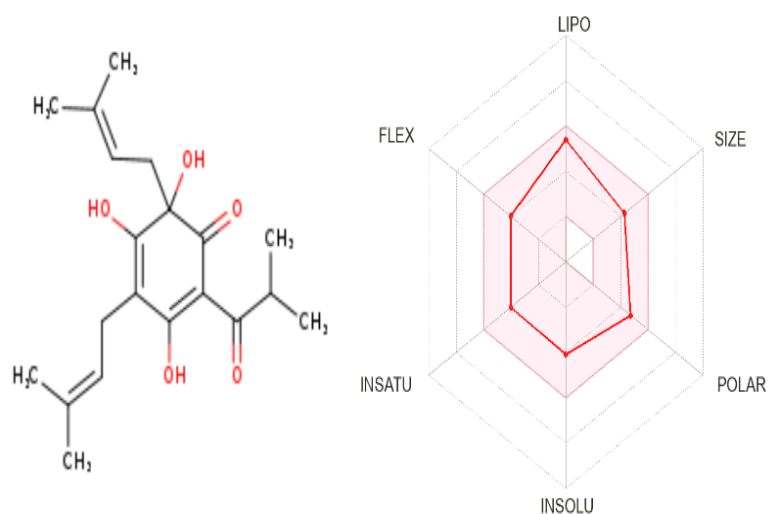
Fonte: Elaboração própria.

Figura 13b: Radar de biodisponibilidade predito pela ferramenta SwissADME. À esquerda temos a estrutura do alfa ácido (adhumulona) e à direita o radar, em que as áreas em rosa representam cada propriedade, destacando-se lipofilicidade, peso molecular, solubilidade e flexibilidade.



Fonte: Elaboração própria.

Figura 13c: Radar de biodisponibilidade predito pela ferramenta SwissADME. À esquerda temos a estrutura do alfa ácido (cohumulona) e à direita o radar, em que as áreas em rosa representam cada propriedade, destacando-se lipofilicidade, peso molecular, solubilidade e flexibilidade.



Fonte: Elaboração própria.

Contudo, na avaliação de excreção, as três moléculas apresentaram perfis positivos de interação com a glicoproteína de permeabilidade P-gp e com enzimas CYP em alguns casos (detalhes na tabela 3). Por fim, a análise de solubilidade indicou que humulona e cohumulona apresentam solubilidade moderada nos parâmetros ESOL e Ali, enquanto a adhumulona demonstrou solubilidade moderada em ESOL, mas fraca em Ali.

Tabela 3. Dados obtidos da predição das propriedades e potencial farmacológico dos alfa ácidos através da ferramenta SwissADME

Regra dos cinco de Lipinski					
Molécula	m/m	Ligações rotacionáveis	Ligação de receptor de H	Ligação de doador de H	Log P
Humulona	362.46	7	5	3	3.39
Adhumulona	376.49	7	5	3	3.45
Cohumulona	348.43	6	5	3	3.11

Farmacocinética					
Substrato Pgp	Inibidor CYP1A2	Inibidor CYP2C19	Inibidor CYP2C9	Inibidor CYP2D6	Inibidor CYP3A4
Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim
Sim	Não	Não	Não	Sim	Sim
Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim

Violações						
Lipinski	Ghose	Veber	Egan	Muegge	Score de Bioavaliabilidade	PAINS
0	0	0	0	0	0,56	0
0	0	0	0	0	0,56	0
0	0	0	0	0	0,56	0

Fonte: Elaboração própria.

4 DISCUSSÃO

No presente trabalho, demonstramos que o extrato de lúpulo, obtido pelo método de extração utilizando hexano, apresenta expressiva atividade antioxidante, sendo possível isolar a partir dele altas concentrações de resina macia contendo alfa ácidos. Além disso, demonstrou-se, a partir do *docking* molecular, que os alfa ácidos podem de fato, ligar-se ao receptor GABA_A, tendo elucidado a forma como estas moléculas interagem com o receptor na posição investigada.

O lúpulo é uma planta notável entre as espécies vegetais, devido às suas propriedades farmacológicas significativas, principalmente devido às inflorescências femininas, que contêm glândulas de lupulina. A lupulina, uma parte expressiva da resina do lúpulo, compreende de 15 a 30% do peso seco das inflorescências (Bertelli *et al.*, 2018). Ela pode ser subdividida em duas categorias: resinas macias, que são solúveis em hexano, e resinas duras, que são insolúveis em hexano. As resinas macias incluem os alfa ácidos e beta ácidos, representados, respectivamente, pela humulona e lupulona (Zanoli e Zavatti, 2008).

Os alfa ácidos do lúpulo são compostos por várias substâncias, incluindo a humulona, cohumulona, adhumulona, prehumulona e poshumulona (Fischer, 2021). A avaliação da composição do extrato no presente trabalho corrobora com a descrição apontada no estudo de Durello, Silva e Junior (2019), no qual descrevem a seguinte proporção das cinco humulonas análogas, sendo a humulona (35-70%), a cohumulona (20-55%), a adhumulona (10-15%), a prehumulona (1- 10%) e a poshumulona (1-3%) do total de alfa ácidos.

Estudos relatam benefícios dos compostos existentes no lúpulo e o caracteriza como uma planta com diversas propriedades de aplicação medicinal, destacando seus possíveis efeitos na saúde dos indivíduos. Um deles é o fato de apresentar propriedades antioxidantes, característica que tem despertado atenção da comunidade de investigação biomédica (Zugravu *et al.*, 2022). A atividade antioxidante está relacionada à eficácia do lúpulo em atuar na prevenção e/ou tratamento de diversas doenças e, ao mesmo tempo, estar isento de efeitos colaterais importantes (Pizzino *et al.*, 2017).

Pesquisas envolvendo antioxidantes de fontes naturais aumentaram no final do século 20 e início do século 21, e continuam a crescer no Brasil e no mundo, devido aos benefícios associados ao consumo dessas substâncias para a saúde (Soares, 2022). O mais recente lançamento no mercado, envolvendo produto antioxidante a base de lúpulo, é a água lupulada, que tem atraído consumidores por oferecer os benefícios das propriedades antioxidantes do lúpulo sem o sabor amargo e o teor alcoólico presentes na cerveja (Santos *et al.*, 2023).

O incentivo ao consumo dos compostos antioxidantes através da alimentação ou sua suplementação é crescente, e visa contribuir com o equilíbrio redox endógeno em seres humanos, pois apresentam a capacidade de retardar ou inibir a oxidação de diversos substratos, oferecendo assim, uma importante proteção para o organismo humano (Podsdek *et al.*, 2007).

A busca crescente pela determinação do potencial antioxidante de diferentes compostos naturais para o desenvolvimento de produtos com propriedades benéficas tem como aliada diferentes metodologias para a determinação da capacidade antioxidante. Dessa forma, considerando as vantagens e aplicabilidade de cada tipo de método, recomenda-se a utilização de dois ou mais métodos, pois uma técnica aplicada isoladamente não irá refletir a capacidade antioxidante total de uma amostra (Sucupira *et al.*, 2012). De acordo com o preconizado, nosso estudo analisou a atividade antioxidante do extrato de lúpulo através de diferentes tipos de métodos.

Os resultados obtidos nos métodos analisados demonstraram que o extrato de lúpulo apresentou importante atividade antioxidante. Estudos anteriores confirmam este achado (Almeida, 2019; Arruda, 2020; Astray, 2020; Nascimento, 2023; Niknejad *et al.*, 2015 e Santana, 2020), ressaltando a variedade de compostos envolvidos no efeito antioxidante do lúpulo. Em geral, observou-se efeito concentração-dependente, mostrando que, quanto maior a concentração de extrato, maior o efeito antioxidante.

Os valores observados da atividade antioxidante em nosso estudo, por meio do método DPPH, corrobora com o estudo de Silva e colaboradores (2022) que avaliaram a atividade antioxidante de extratos de diferentes variedades de lúpulo. Uma das variedades analisadas, na concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, exibiu atividade antioxidante (86,17%), enquanto nosso extrato, na mesma concentração, apresentou atividade antioxidante (85,34%). Esse estudo também demonstrou que o aumento da concentração levou a uma maior atividade antioxidante em todas as variedades de lúpulo testadas.

Em relação ao método ABTS, observa-se uma atividade antioxidante mais expressiva, em especial se comparado com as menores concentrações (31,25; 62,5; 125 e $250 \mu\text{g mL}^{-1}$). Esses achados são corroborados por estudos anteriores, como em Nascimento (2023) e Santana (2020). Este método utiliza o radical ABTS e reforça os resultados de DPPH ao fornecer uma perspectiva adicional da capacidade antioxidante. Essa abordagem complementar permite uma avaliação da eficácia dos extratos de lúpulo em neutralizar radicais livres e é considerada, do ponto de vista metodológico, uma dos mais fáceis, precisas e reprodutivas na avaliação da atividade antioxidante de extratos vegetais (Alves *et al.*, 2010).

Ao analisar o comportamento da absorbância pelo método do Poder Redutor e do Complexo Fosfomolibdênio, em relação ao acréscimo da concentração, foi possível perceber uma tendência de aumento, porém discreta nas menores concentrações. No entanto, mais significativa nas concentrações de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $500 \mu\text{g mL}^{-1}$.

O estudo de George, Corina e Gheorghe (2015) realizou o ensaio de fosfomolibdênio do extrato de lúpulo e constatou sua capacidade antioxidante total superior ao extrato de mirtilo, que apresenta uma concentração maior de compostos fenólicos comparado ao lúpulo. Esse resultado corrobora com o vigente estudo, pois o extrato apresentou atividade antioxidante. Essa capacidade antioxidante também foi mencionada no estudo de Niknejad e colaboradores (2015), ao descrever a habilidade do extrato de lúpulo em doar elétrons para a redução do complexo Fe^{3+} ferricianeto para Fe^{2+} ferrocianeto, assim como o presente trabalho, pois os resultados indicam tal atividade no método do Poder Redutor.

Os valores obtidos da avaliação dos compostos fenólicos totais demonstram o potencial antioxidante do nosso extrato, que apresentou resultados superiores a outros estudos. O estudo de Silva (2020) quantificou os compostos fenólicos em folhas de *H. lupulus* e obteve um teor de $91,85 \text{ mg EAG g}^{-1}$. Enquanto o estudo de Arruda e colaboradores (2021) analisou extratos hidroetanólicos em duas variedades de lúpulo e o maior valor obtido do teor de compostos fenólicos foi $35,10 \text{ EAGg}^{-1}$. Também é importante ressaltar que os estudos mencionados utilizaram metodologias de extração e solventes distintos ao empregado em nosso estudo.

Nesse contexto, vale destacar vários fatores relevantes para a obtenção dos resultados do presente estudo, sendo um deles o preparo do extrato utilizando-se pellets. Almeida e colaboradores (2019) atribuem a expressiva atividade antioxidante de seu extrato à utilização de pellets para seu preparo. Segundo os autores, isto garante a máxima integridade dos compostos presentes no lúpulo, consequentemente, impacta em sua atividade antioxidante.

Outro aspecto que deve ser enfatizado em nosso estudo é o método de extração do lúpulo, no qual foi utilizado um solvente apolar, que alterou de forma expressiva os resultados obtidos. Nosso extrato demonstrou atividade antioxidante superior em uma concentração significativamente inferior àquela observada em estudos anteriores, cujos métodos de extração foram agitação magnética, ultrassom e à frio, utilizando solvente aquoso (Teixeira *et al.*, 2024).

A utilização de método distinto em nosso extrato contribuiu para a formação de um extrato com elevada concentração de alfa ácidos, em especial a humulona, a qual apresenta atividade quelante de metais, como ferro e cobre, o que ajuda a diminuir a formação de espécies reativas de oxigênio catalisados por esses metais (Durello; Silva; Junior, 2019). Assim, a

seleção da tecnologia de extração adequada, bem como do solvente apropriado, é fundamental, pois os métodos de extração podem desempenhar um papel importante no nível e nos tipos de antioxidantes obtidos (Astray *et al.*, 2020).

Desta forma, o poder antioxidante do lúpulo demonstrado em nosso extrato, pode favorecer e beneficiar o tratamento de diversas condições clínicas que acometem o SNC. Com efeito, o cérebro é particularmente vulnerável a eventos de estresse oxidativo, visto que é responsável pelo consumo de 20% de todo o oxigênio advindo da respiração. Esse fato justifica-se pela sua alta atividade metabólica e demanda energética, além de apresentar grande número de mitocôndrias. Além disso, o SNC é repleto de ácidos graxos insaturados e rico em ferro, o que proporciona um ambiente molecular propício à peroxidação lipídica. Outra característica relevante é o fato do cérebro manter baixos níveis de antioxidantes, principalmente o hipocampo, o que demonstra baixa capacidade de reparo (Rosa, 2020).

Entre os danos neurológicos associados ao estresse oxidativo, estudos apontam a epilepsia e a refratariedade ao seu tratamento farmacológico (Bellissimo *et al.*, 2001; Cardenas *et al.*, 2013). Além disso, descrevem a piora da crise epiléptica e a progressão da epilepsia aos achados de elevação da peroxidação lipídica, diminuição de enzimas antioxidantes e superprodução de espécies reativas de oxigênio. Portanto, relacionam o estresse oxidativo como importante componente da epileptogênese (Liu *et al.*, 2010). Assim, considerando o importante papel do estresse oxidativo na geração de crises epilépticas, é importante avaliar compostos com elevada capacidade antioxidante, a fim descobrir novas abordagens terapêuticas para a epilepsia, como o extrato avaliado pelo nosso estudo.

Tendo em vista a presença da humulona em nosso extrato e a predominância da mesma em relação aos demais alfa ácidos, acredita-se em sua promissora atividade GABAérgica. O estudo de Benkherouf e colaboradores (2020) demonstrou que a humulona potencializa as correntes induzidas por GABA nos receptores $\alpha 1\beta 3\gamma 2$, confirmando a modulação alostérica positiva da humulona sobre o receptor GABA_A e seu comportamento sedativo e hipnótico. O mesmo estudo descreveu a possibilidade da presença dos alfa ácidos cohumulona e adhumulona, que são estruturalmente muito semelhantes à humulona, exibirem efeitos modulatórios fracos nos receptores GABA_A, e, potencialmente, competirem pelo mesmo sítio de ligação da humulona, reduzindo sua potência.

Assim, a partir das evidências já existentes, investigamos, através do método *in silico*, a capacidade de ligação dos alfa ácidos ao receptor GABA_A em sua subunidade mais abundante $\alpha 1\beta 2\gamma 2$. O método de *docking* prediz que ocorre a ligação dos alfa ácidos isolados do extrato com o receptor GABA_A e a forma como estes compostos interagem com o receptor na posição

investigada. Evidenciou-se, pela primeira vez, a predição da ligação dos três alfa ácidos no mesmo sítio ativo predito do receptor, entretanto, estabelecendo tipos de ligações distintos entre si. A partir desta observação, é possível postular que cohumulona e adhumulona são capazes de interferir na ligação da humulona ao receptor GABA_A, reduzindo a potência deste último, conforme observado no estudo de Benkherouf e colaboradores (2020).

Em relação à estrutura do receptor GABA_A, sabe-se que, como muitos outros canais dependentes de ligantes, é um heteropentâmero que apresenta um total de vinte subunidades (Perucca; Bialer; White, 2023), as quais se reúnem em combinações limitadas para formar receptores funcionais. A isoforma sináptica predominante compreende duas subunidades $\alpha 1$, duas subunidades $\beta 2$ e uma subunidade $\gamma 2$. A combinação das subunidades $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ do receptor GABA_A é a mais abundante (60%), e medeia efeitos sedativo, amnésico e antiepiléptico de agonistas benzodiazepínicos, porém, as combinações $\alpha 2\beta 3\gamma 2$ (15-20%) e $\alpha 3\beta 3\gamma 2$ também são altamente prevalentes. Essa complexa montagem de subunidades lhe confere uma rica farmacologia (Zhu *et al.*, 2018).

Considerando a complexidade envolvida entre a ligação de um ligante e seu receptor, chama a atenção para a ligação do resíduo Arg37 exclusivamente na ligação realizada pela humulona e o receptor GABA_A. Este resíduo foi descrito no estudo de Hibbs e Gouaux (2011), presente na alça G com relevante papel na ativação do canal de cloreto α (GluCl) controlado por glutamato de *Caenorhabditis elegans*. Nesse estudo, observou-se a localização desse aminoácido em elementos da estrutura da proteína diretamente conectados ao poro do canal iônico, o que favorece a abertura dos canais de cloro, envolvido na ativação do receptor, mas não na ligação aos receptores GABA_A.

Outro estudo mais recente também atribui importância semelhante ao Arg37 e destaca que a alça G da subunidade α do receptor GABA_A contribui com resíduos para a interface complementar próxima ao local de ligação ortostérica nos receptores heteropentaméricos GABA_A. O alinhamento revela que a subunidade $\alpha 1$ Thr47 é totalmente conservada entre todas as subunidades α do GABA_A na posição equivalente à de Arg37 (Baptista-Hon; Gulbinaite; Hales, 2017).

De modo semelhante aos alfa ácidos estudados, o CBD, descrito como agente antiepiléptico (Gobira *et al.*, 2015; Morano *et al.*, 2016; Radwan, 2015; Romano e Hazekamp, 2013), é referido, em vários estudos recentes, como modulador alostérico positivo do receptor GABA_A (Ruffolo *et al.*, 2022; Bakas *et al.*, 2017). De fato, um estudo recente relatou que a administração concomitante de CBD e clobazam apresentou maior potência antiepiléptica, comparada ao uso isolado do clobazam, por aumentar significativamente a transmissão mediada

pelo receptor GABA_A (Anderson *et al.*, 2019). Estudos afirmam, ainda, que a eficácia do CBD no tratamento da epilepsia está muito relacionada a sua mediação GABAérgica (Morano *et al.*, 2016; Ruffolo *et al.*, 2018).

Através do *docking* molecular, presumimos o sítio de ligação do CBD no receptor GABA_A. Importante ressaltar que nosso estudo sugeriu que a ligação do CBD ocorre na proximidade de ligação dos alfa ácidos ao receptor ($\alpha 1\beta 2\gamma 2$). Observamos, ainda, semelhança entre a vizinhança dos aminoácidos que envolvem o CBD com o ligante aos resíduos que circundam os alfa ácidos.

Como descrito anteriormente, em vista da necessidade de se associar fármacos para uma melhor resposta terapêutica, é importante considerar os parâmetros dinâmicos e cinéticos que possibilitem uma combinação sinérgica de drogas, bem como redução de efeitos colaterais que possam otimizar as terapias atualmente empregadas (Lee, 2014). Nesse contexto, estudos descrevem o lúpulo como uma alternativa segura e eficaz para o desenvolvimento de fármacos (Zanoli e Zavatti, 2008), corroborando com os resultados do nosso estudo.

Entretanto, é preciso ressaltar as ligações estabelecidas, em especial pela humulona, com o substrato da proteína Pgp, e na inibição das enzimas CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6 e CYP3A4, conforme demonstramos. Esse achado sugere potencial alvo de interação farmacológica, porém estudos futuros são necessários para maiores elucidações. Desta forma, os achados do presente estudo apontam para uma investigação promissora do lúpulo no tratamento da epilepsia.

5 CONCLUSÃO

Conclui-se que o extrato de lúpulo desenvolvido nesse estudo destaca-se por sua importante atividade antioxidante e elevada concentração de alfa ácidos. Além disso, nossos resultados predizem que há ligação dos alfa ácidos ao receptor GABA_A, o que sugere que o lúpulo apresenta grande potencial para ser utilizado no tratamento da epilepsia.

Assim, esse estudo mostra-se inovador ao propor a investigação de uma terapêutica alternativa que seja capaz de prevenir e ou tratar a epileptogênese e suas consequências deletérias, sendo importante a realização de estudos futuros para comprovar tal efeito.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON L. L. *et al.* Coadministered cannabidiol and clobazam: Preclinical evidence for both pharmacodynamic and pharmacokinetic interactions. *Epilepsia*. v. 60, n.11, p. 2224-2234, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/epi.16355>

ALMEIDA, A. R. *et al.* Bioactive compounds and antioxidant activities of Brazilian hop (*Humulus lupulus* L.) extracts. **International Journal Of Food Science & Technology**, [S.L.], v. 55, n. 1, p. 340-347, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/ijfs.14311>

ALVES, C. Q. *et al.* Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**. v. 33, n. 10, p. 2202–2210, ano 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010001000033>

ANTUNES, M. D. C. *et al.* Effects of postharvest application of 1-MCP and postcutting dip treatment on the quality and nutritional properties of fresh-cut kiwifruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 58, n. 10, p. 6173-6181, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf904540m>

AOSHIMA, H. *et al.* Effects of beer and hop on ionotropic gamma-aminobutyric acid receptors. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 54, n.7, p.2514-9, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf051562a>

ARRUDA, T. R. **Atividades antioxidante e antimicrobiana dos primeiros cultivares de lúpulo (*Humulus lupulus* L.) produzidos no Brasil**. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre – ES. 2020. Disponível em: <https://repositorio.ufes.br/items/e5b26e20-a208-436e-a49c-d8e1a4a10c63>

ASTRAY, G. *et al.* Humulus lupulus L. as a Natural Source of Functional Biomolecules. **Applied Sciences**. v. 10, n. 15, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/app10155074>. 20.

BAKAS, T. *et al.* The direct actions of cannabidiol and 2-arachidonyl glycerol on GABA-A receptors. **Pharmacological Research**. v. 119, p. 358–370, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.02.022>

BAPTISTA-HON, D. T.; GULBINAITE, S.; HALES, T. G. Loop G in the GABA_A receptor α 1 subunit influences gating efficacy. **The Journal of Physiology**. v. 595, n. 5, p.1725-1741, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1113/JP273752>

BELLISSIMO, M. I. *et al.* Superoxide dismutase, glutathione peroxidase activities and the hydroperoxide concentration are modified in the hippocampus of epileptic rats. **Epilepsy Research**. v. 46, n. 2, p.121–128, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0920-1211\(01\)00269-8](https://doi.org/10.1016/S0920-1211(01)00269-8)

BENKHEROUF, A. Y. *et al.* Humulone Modulation of GABA_A Receptors and Its Role in Hops Sleep-Promoting Activity. **Frontiers in Neuroscienze**. v. 14, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.594708>

- BERTELLI, D. *et al.* Nuclear magnetic resonance and high-performance liquid chromatography techniques for the characterization of bioactive compounds from *Humulus lupulus* L. (hop). **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 410, n. 15, p. 3521-3531, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00216-018-0851-y>
- BURLEY, S. K. *et al.* RCSB Protein Data Bank (RCSB.org): delivery of experimentally-determined PDB structures alongside one million computed structure models of proteins from artificial intelligence/machine learning. **Nucleic Acids Research**. v. 51, n. 1, p.488–508, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1077>
- CARDENAS, R. N. *et al.* Role of Oxidative Stress in Refractory Epilepsy: Evidence in Patients and Experimental Models. **Internacional Journal of Molecular Sciences**. v. 14, p. 1455-1476, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms14011455>
- DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**. v. 7, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep42717>
- DUBOVSKY, S. L.; MARSHALL, D. Benzodiazepines Remain Important Therapeutic Options in Psychiatric Practice. **Psychotherapy and Psychosomatics**. v. 91, n. 5, p.307-334, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000524400>
- DURELLO, R. S.; SILVA, L. M.; JUNIOR, S. B. Química do Lúpulo. **Química Nova**. v. 42, n. 8, p. 900-919, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170412>
- FERREIRA, D. F. Sisvar: um sistema computacional de análise estatística. *Ciência e Agrotecnologia*. v.35, n. 6, p. 1039-1042, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1413-70542011000600001>
- FISCHER, B. **Obtenção e caracterização de óleo essencial e extrato de lúpulo (*Humulus lupulus*) por hidrodestilação e extração com CO₂ subcrítico**. Tese de Doutorado, Universidade regional integrada do alto Uruguai e das missões, Erechim. 2021. Disponível em: https://www.uricer.edu.br/cursos/arq_trabalhos_usuario/4226.pdf. Acesso em: 22 de junho 2023.
- GASPARIN, G. P. *et al.* Utilização de plantas medicinais e sua química diversidade e genética. **Brazilian Journal of Development**. v. 8, p. 27678-27690, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.34117/bjdv8n4-321>
- GEORGE, B.; CORINA, B.; GHEORGHE, C. Antioxidant activity of *Humulus lupulus* and *Vaccinium myrtillus* individual and combined extracts. **Romanian Biotechnological Letters**. v. 20, n. 2, p. 10277-10285, 2015. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/282204935>. Acesso em: 14 de maio de 2024.
- GOBIRA, P. H. *et al.* Cannabidiol, a Cannabis sativa constituent, inhibits cocaine-induced seizures in mice: Possible role of the mTOR pathway and reduction in glutamate release. **NeuroToxicology**. v. 50, p.116-121, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2015.08.007>

HIBBS, R. E.; GOUAUX, E. Principles of activation and permeation in an anion-selective Cys-loop receptor. **Nature**. v. 474, p. 54–60, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature10139>

HOEK, A. C.; HERMANS-LOKKERBOL, A. C.; J.; VERPOORTE, R. An improved NMR method for the quantification of α -acids in hops and hop products. **Phytochemical Analysis**. v. 12, n. 1, p. 53–57, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1002/1099-1565\(200101/02\)12:1<53::AID-PCA550>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/1099-1565(200101/02)12:1<53::AID-PCA550>3.0.CO;2-E)

KARABÍN, M. *et al.* Biotransformations and biological activities of hop flavonoids. **Biotechnology advances**. v. 33 (6 Pt 2), p. 1063–1090, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.02.009>

KARABÍN, M. *et al.* Biologically Active Compounds from Hops and Prospects for Their Use. **Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.** v.15, n. 3, p. 542–567, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12201>

KIM, S. *et al.* E. E. (2023). PubChem 2023 update. **Nucleic Acids Research**. v. 51, p. 1373–1380, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkac956>.

LEE, S. K. Old versus New: Why do we need new antiepileptic drugs?. **Journal of Epilepsy Research**. v. 4, n. 2, p. 39–44, v. 4, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1055/s-2006-959980>

LIPINSKI, C. A. *et al.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 64, p. 4–17, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.019>

LIU, J. *et al.* Oxidative stress mediates hippocampal neuron death in rats after lithiumpilocarpine-induced status epilepticus. **Seizure**, v. 19, n. 3, p. 165–172, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2010.01.010>

LOPES-LUTZ, D. *et al.* Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of Artemisia essential oils. **Phytochemistry**. v. 69, n. 8, p.1732–1738, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.02.014>

MORANO, A. *et al.* Cannabis in epilepsy: From clinical practice to basic research focusing on the possible role of cannabidiol. **Epilepsia Open**. v. 1, n. 3, p. 145–151, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/epi4.12015>

NASCIMENTO, F. M. **Principais constituintes de flores de lúpulo: análise do potencial antioxidante e para o tratamento de gota, diabetes do tipo 2 e doença de Alzheimer.** Orientadora: Maria Teresa Salles Trevisan. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2023. Disponível em: <https://repositorio.ufc.br/handle/riufc/226/simple-search?filterquery=QU%C3%8DMICA&filtername=cnpq&filtertype>equals>. Acesso em: 23 de abril 2024.

NESTLER, E. J.; HYMAN, S. E.; MALENKA, R. C. **Molecular neuropharmacology.** A Foundation for Clinical Neuroscience. 2° ed. New York: McGraw Hill Medical, 2009.

NIKNEJAD, F. *et al.* Antifungal and Antioxidant Effects of Hops (*Humulus lupulus* L.) Flower Extracts. **Advances In Environmental Biology**. v. 24, n. 8, p. 395-401, 2015. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/273254229>. Acesso em: 03 de abril 2024.

OYAIZU, M. Studies on products of the browning reaction. Antioxidative activities of browning reaction products prepared from glucosamine. **The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics**, v. 44, n. 6, p. 307- 315, 1986. Disponível em: <https://doi.org/10.5264/eiyogakuzashi.44.307>

PERUCCA, E.; WHITE, H. S.; BIALER, M. New GABA-Targeting Therapies for the Treatment of Seizures and Epilepsy: II. Treatments in Clinical Development. **CNS Drugs**. v. 37, n. 9, p. 781-795, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40263-023-01025-4>.

PERUCCA, E.; BIALER, M.; WHITE, H.S. New GABA-Targeting Therapies for the Treatment of Seizures and Epilepsy: I. Role of GABA as a Modulator of Seizure Activity and Recently Approved Medications Acting on the GABA System. **CNS Drugs**. v. 37, n. 9, p. 755-779, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40263-023-01025-4>

PIZZINO, G. *et al.* Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. v. 2017, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>

PODSEDEK, A. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. **LWT-Food Science and Technology**. v. 40, n. 1, p. 1-11, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.07.023>

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**. v. 269, n. 2, p. 337-341, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4019>

RADWAN, M. M. *et al.* “Isolation and Pharmacological Evaluation of Minor Cannabinoids from High-Potency Cannabis sativa.” **Journal of natural products**. v. 78, n. 6, p. 1271-1276, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00065>

ROMANO, L. L.; HAZEKAMP, A. Cannabis oil: chemical evaluation of an upcoming cannabis-based medicine. **Cannabinoids**. v. 1, n. 1, p.1–11, 2013. Disponível em: https://bio-creations.com/wp-content/uploads/2024/05/2013-cannabis-oil-chemical-evaluation-of-an-upcoming-cannabis-based-medicine_romano.pdf. Acesso em: 14 de Agosto 2023.

ROSA, L. D. **Estudo comportamental e neuroquímico do β -cariofileno no modelo de epileptogênese induzida por pilocarpina em camundongos**. Orientador: Carla Thiciane Vasconcelos de Melo. Dissertação (Mestrado) - Programa Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, Sobral, 2020. Disponível em: <http://repositorio.ufc.br/handle/riufc/58894>. Acesso em: 08 de maio 2023.

ROSS, S. M. Sleep disorders: a single dose administration of valerian/hops fluid extract (dormeesan) is found to be effective in improving sleep. **Holistic nursing practice**. v. 23, n. 4, p. 253–256, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/HNP.0b013e3181aed09d>

RUFFOLO, G. *et al.* A novel GABAergic dysfunction in human Dravet syndrome. **Epilepsia**. v. 59, n. 11, p. 2106–2117, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/epi.14574>

RUFFOLO, G. *et al.* GABAergic Neurotransmission in Human Tissues Is Modulated by Cannabidiol. **Life (Basel, Switzerland)**. v. 12, n. 12, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/life12122042>

SANTANA, V. N. **Avaliação da composição química da atividade biológica de *Humulus lupulus* var. *Columbus***. Orientador: Baraquizio Braga do Nascimento Junior. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Jequié, 2020. Disponível em: <http://www2.uesb.br/ppg/ppgquimica/wp-content/uploads/2021/10/Disserta%C3%A7%C3%A3o-Vanessa-Neres.pdf>. Acesso em: 17 de junho de 2023.

SANT'ANNA, C.M.R. Glossário de termos usados no planejamento racional de fármacos (recomendação da IUPAC para 1997). **Química Nova**. v.25, n.3, p. 505-512, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000300027>

SANTOS, *et al.* Avaliação de fenois totais e atividade antioxidante em água lupulada. **Revista AgroTecnologia**. v. 15, n. 1, p.50-56, 2024. Disponível em: <https://www.revista.ueg.br/index.php/agrotecnologia/article/view/15031>. Acesso em: 14 de novembro de 2024.

SANTULLI, L. *et al.* The challenges of treating epilepsy with 25 antiepileptic drugs. **Pharmacological research**. v. 107. p. 211-219, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.03.016>

SILVA, J. V. N., *et al.* Evaluation of antioxidant activity and content of phenolic compounds in 3 varieties of commercial flavoring hops and 3 bittering hops. **Brazilian Journal of Development**. v. 8, n. 10, p. 66076-66096, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.34117/bjdv8n10-085>

SINGLETON, V. L; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic - phosphotungstic acid reagent. **American Journal of Enology and Viticulture**. v. 16, p. 144–158, 1965. Disponível em: <https://doi.org/10.5344/ajev.1965.16.3.144>

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**. v. 15, n. 1, p. 71-81, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1415-52732002000100008>

SUCUPIRA, N. R. *et al.* Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. **Journal of Health Sciences**. v. 14, n. 4, 2012. Disponível em: <https://journalhealthscience.pgsscogna.com.br/JHealthSci/article/view/885>. Acesso em: 11 de julho 2024.

TCHEKALAROVA *et al.* “Chronic Agomelatine Treatment Prevents Comorbid Depression in the Post-Status Epilepticus Model of Acquired Epilepsy Through Suppression of

Inflammatory Signaling.” **Neurobiology of Disease**. v. 115, p. 127–144, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.04.005>.

TEIXEIRA, B.C.S. *et al.* **Avaliação *in vitro* antioxidante de três diferentes extratos de lúpulo e sua ação moduladora *in vivo* sobre os efeitos carcinogênicos da doxorrubicina.** Orientador: Marcos de Souza Gomes. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas – MG. 2024. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/43319>. Acesso em: 04 dezembro 2024.

TYLER, V. E. **The New Honest Herbal. A Sensible Guide to Herbs and Related Remedies.** 2º ed., Stickley Co., Philadelphia, p. 125–126, 1987.

WIELAND, H.A.; LUDDENS, H.; SEEBURG, P.H. A single histidine in GABA_A receptors is essential for benzodiazepine agonist binding. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 267, n. 3, p. 1426-1429, 1992. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)45961-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)45961-3)

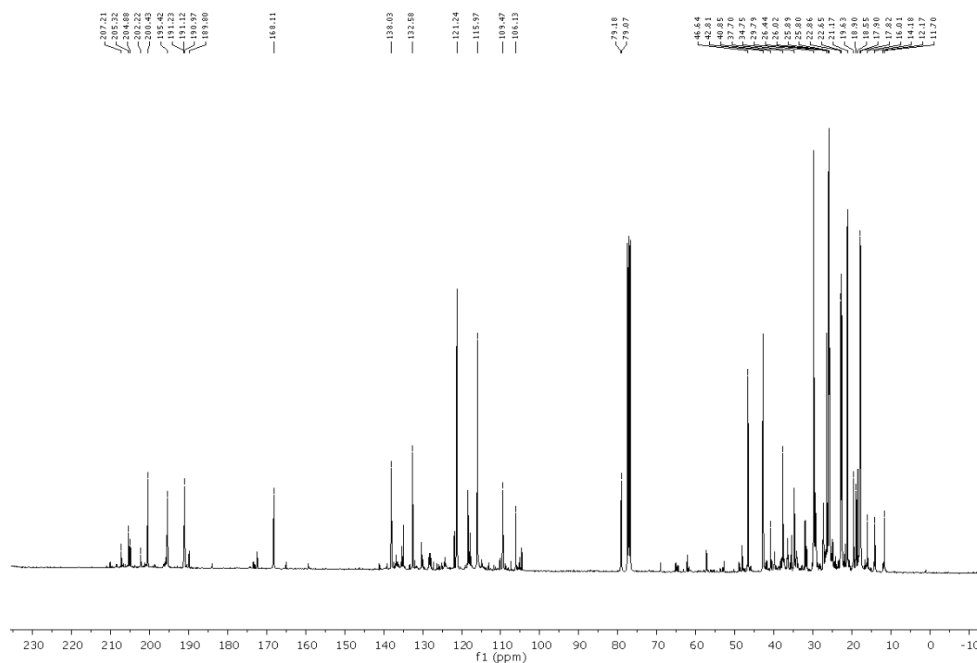
ZANOLI, P.; ZAVATTI, M. Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 116, p. 383–396, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.01.011>

ZHU, S. *et al.* Structure of a human synaptic GABA_A receptor. **Nature**. v. 559, p. 67-72, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0255-3>

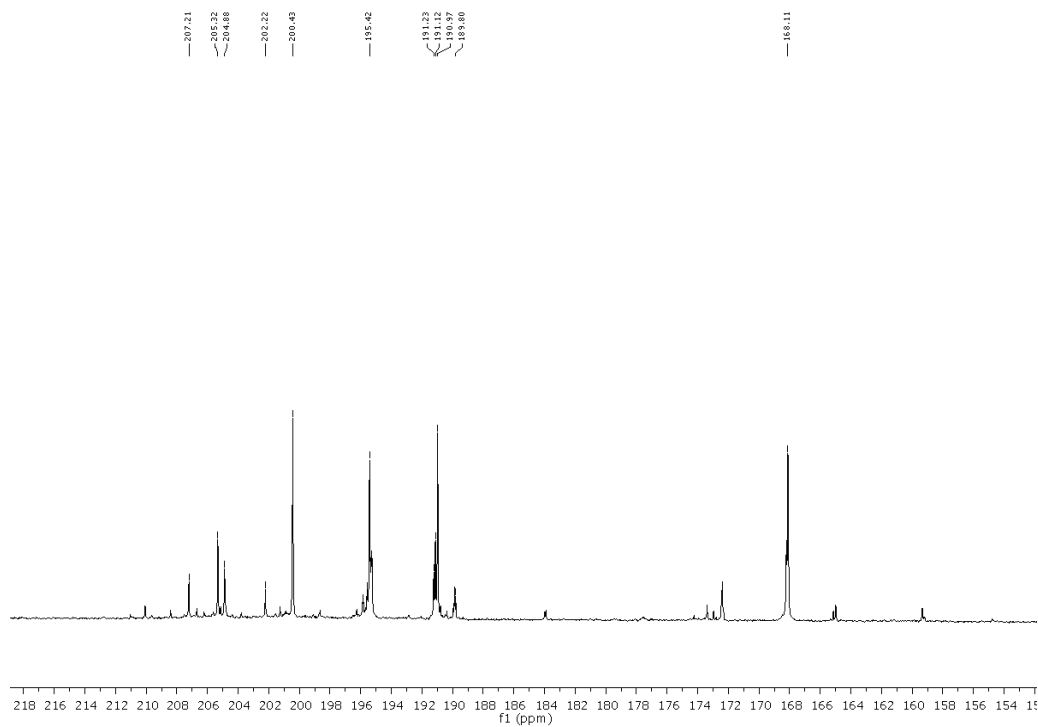
ZUGRAVU, C. A. *et al.* Antioxidants in hops: bioavailability, health effects and perspectives for new products. **Antioxidants (Basel)**. v. 11, n. 2, p. 241, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antiox11020241>

APÊNDICES

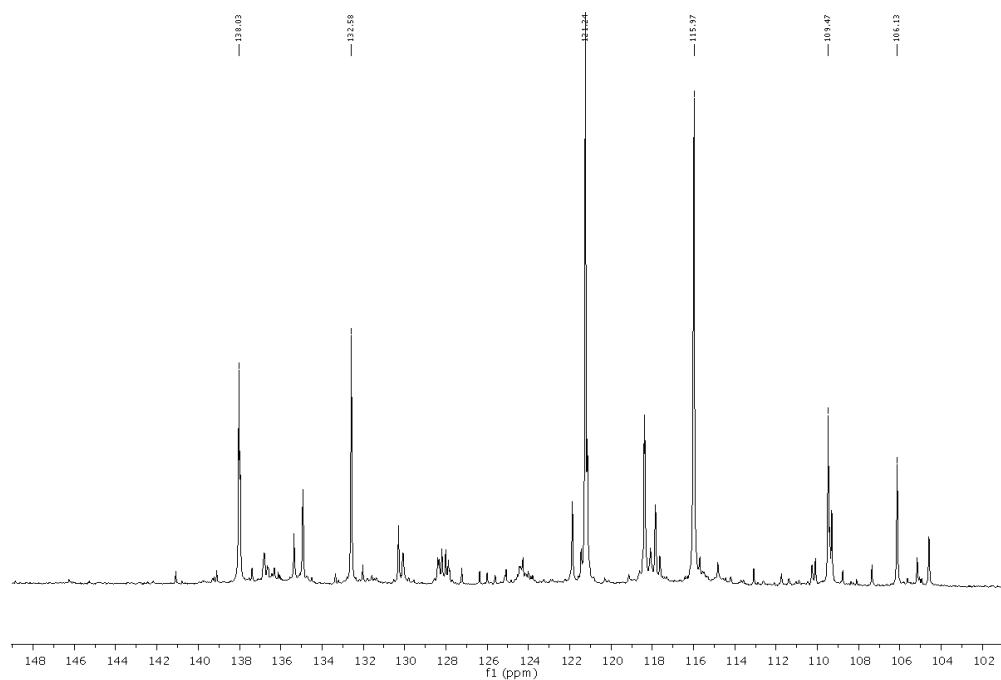
Apêndice A - Espectro de RMN- ^{13}C do extrato.



Apêndice B - Expansão (154-218 ppm) de RMN- ^{13}C do extrato.



Apêndice C - Expansão (102-248 ppm) do espectro de RMN- ^{13}C da amostra.



Apêndice D - Expansão (5-80 ppm) do espectro de RMN- ^{13}C da amostra.

