

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

BRUNA CÁSSIA DA SILVA TEIXEIRA

**AVALIAÇÃO DOS ANTIOXIDANTES PRESENTES EM DIFERENTES EXTRATOS
DE LÚPULO *in vitro* E SUA AÇÃO MODULADORA SOBRE OS EFEITOS
CARCINOGÊNICOS DA DOXORRUBICINA *in vivo***

PATOS DE MINAS – MG

JULHO DE 2024

BRUNA CÁSSIA DA SILVA TEIXEIRA

**AVALIAÇÃO DOS ANTIOXIDANTES PRESENTES EM DIFERENTES EXTRATOS
DE LÚPULO *in vitro* E SUA AÇÃO MODULADORA SOBRE OS EFEITOS
CARCINOGÊNICOS DA DOXORRUBICINA *in vivo***

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

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

**Coorientadora: Prof^a. Dra. Júlia
Ariana de Souza Gomes Lenzi**

**PATOS DE MINAS – MG
JULHO DE 2024**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- T266a
2024
- Teixeira, Bruna Cássia da Silva, 1996-
Avaliação dos antioxidantes presentes em diferentes extratos de lúpulo *in vitro* e sua ação moduladora sobre os efeitos carcinogênicos da doxorubicina *in vivo* [recurso eletrônico] / Bruna Cássia da Silva Teixeira. - 2024.
- Orientador: Marcos de Souza Gomes.
Coorientadora: Júlia Arian de Souza Gomes Lenzi.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2024.5093>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.
1. Biotecnologia. I. Gomes, Marcos de Souza, 1981-, (Orient.). II. Lenzi, Júlia Arian de Souza Gomes, 1986-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. IV. Título.

CDU: 60

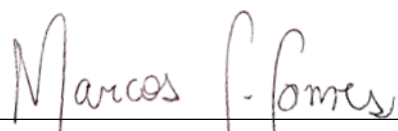
BRUNA CÁSSIA DA SILVA TEIXEIRA

**AVALIAÇÃO DOS ANTIOXIDANTES PRESENTES EM DIFERENTES EXTRATOS
DE LÚPULO *in vitro* E SUA AÇÃO MODULADORA SOBRE OS EFEITOS
CARCINOGÊNICOS DA DOXORRUBICINA *in vivo***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Biotecnologia como requisito
parcial para a obtenção do título
de Mestre em Biotecnologia.

Aprovado em: 31/07/2024

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Marcos de Souza Gomes (Orientador)



Prof. Dr. Gustavo das Graças Pereira



Prof. Dr. Raoni Pais Siqueira

Ao meu irmão Júnio César (*in memória*).

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus por me permitir viver meus sonhos e alcançar meus objetivos. Por viver este processo, por ter me dado forças, por ter colocados pessoas extraordinárias em meu caminho para me amparar e fazer deste ciclo mais leve. É chegado o fim, com extrema alegria e gratidão, o qual até os momentos mais difíceis foram usados para me fortalecer e mostrar minha capacidade. A Ele, toda honra e glória!

Dedico este trabalho aos meus pais, Antônio e Marlene, que em toda minha vida nunca deixaram de acreditar nos meus sonhos e vivê-los comigo, sem nunca haver sombras de dúvida. Ao meu marido, Paulo Júnior, por não permitir que eu desistisse nos momentos de fraqueza, sendo meu alicerce, meu apoiador e admirador. A minha filha, Isadora Júnia, que foi um presente no meio do Mestrado, que chegou para me dar mais forças ainda e mais leveza a vida, filha, esse título também é seu.

Ao meu orientador, professor Dr. Marcos, minha eterna gratidão, você é uma pessoa ímpar. Obrigada por acreditar no meu potencial, pelos ensinamentos, pela paciência e compreensão. Você foi mais que um orientador, foi um amigo que nunca mediu esforços para me ajudar, no início quando eu achava que as “portas estavam se fechando” e tudo cooperava para que eu não realizasse a pós, você aparecia “abrindo as janelas”, com palavras de apoio que tudo daria certo. E você tinha razão, deu certo, estamos finalizando mais essa etapa tão importante em minha vida.

A minha coorientadora, professora Dra. Júlia, obrigada por todos os ensinamentos, por trazer conhecimento em peso ao meu trabalho, mas principalmente por sua doçura e delicadeza neste tempo vivenciado.

E a todos os amigos que a UFU me deu de presente, principalmente aqueles que estiveram sempre comigo em cada etapa, em cada conquista. Em especial as minhas colegas que viraram amigas, Bruna Custódio e Gabriela Tolentino, obrigada por dividir comigo diversos momentos ao longo do mestrado, vocês foram cruciais em minha vida e as levarei para sempre em meu coração! Agradeço também a todas as pessoas que direta e indiretamente contribuíram para minha formação.

Aos membros da banca pela disposição.

Aos professores e funcionários da UFU.

A todos muito obrigada!

RESUMO GERAL

O *Humulus lupulus*, conhecido popularmente como lúpulo, possui glândulas de lupulina, que são responsáveis pela secreção de um pó rico em resinas, polifenóis e óleos essenciais, que conferem características como aroma, amargor e propriedades antioxidantes. O lúpulo, além de ser usado na indústria cervejeira, pode desempenhar um papel relevante no combate ao estresse oxidativo celular, por meio da sua atividade antioxidante. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antioxidante *in vitro* e moduladora *in vivo* de extratos de três variedades de lúpulo (El dorado, Ekuanot e Hércules). O lúpulo apresenta propriedades de interesse medicinais, destacando-se pela riqueza em compostos fitoquímicos. Pesquisas evidenciaram altos níveis de flavonoides, conferindo-lhe esta ação antioxidante, além do potencial antitumoral. Entretanto, há poucos conhecimentos acerca dos benefícios dos fitoquímicos que o lúpulo pode proporcionar à saúde humana. Então, os extratos obtidos pelos métodos extrativos à frio, por agitação magnética e por ultrassom, foram analisados quanto à capacidade antioxidante *in vitro*. Os resultados dos ensaios de DPPH evidenciaram que os extratos das variedades El dorado e Ekuanot, obtidos pelos métodos de extração a frio e Ultrassom, apresentaram maior atividade antioxidante ($p < 0,05$), enquanto o extrato da variedade Hércules, extraído por agitação magnética, demonstrou menor atividade antioxidante. Resultados similares foram obtidos no teste de ABTS. Já em relação a quantificação de compostos fenólicos totais, a variedade Ekuanot ($37,06 \text{ mg EAGg}^{-1}$) na extração por Ultrassom apresentou o melhor resultado encontrado. Ao analisar os resultados obtidos do complexo fosfomolibdênio e do poder redutor, foi possível estabelecer uma similaridade entre os dois métodos, destacando a maior atividade antioxidante no extrato Ekuanot, proveniente da extração por ultrassom, e a menor atividade antioxidante para a variedade Hércules, extraída por agitação magnética. Embora os extratos tenham demonstrado atividade antioxidante em todas as análises realizadas, as variedades Ekuanot e Eldorado apresentaram maior potencial antioxidante, e considerando a metodologia de extração, o método extrativo por ondas ultrassônicas se destacou por proporcionar a maior extração do composto analisado. Ademais, o teste de tumores epiteliais em *Drosophila melanogaster* mostrou a ausência de efeito carcinogênico dos três extratos de lúpulo obtidos por meio dos diferentes métodos. Igualmente, verificou-se a inibição da formação de clones de tumores epiteliais em *D. melanogaster* e modulação do efeito carcinogênico da doxorubicina em todos os três extratos. Por meio do mesmo teste foi mostrada a atividade protetora dos extratos às células somáticas de *D. melanogaster*.

Palavras chave: Ácidos-amargos, Compostos fenólicos, *Drosophila melanogaster*, Lupulina.

ABSTRACT

Humulus lupulus, popularly known as hops, has lupulin glands that are responsible for secreting a powder rich in resins, polyphenols and essential oils, which provide characteristics such as aroma, bitterness and antioxidant properties. In addition to being used in the beer industry, hops can play an important role in combating cellular oxidative stress through their antioxidant activity. Thus, the objective of this study was to evaluate the *in vitro* antioxidant and *in vivo* modulating activity of extracts from three varieties of hops (El Dorado, Ekuanot and Hércules). Hops have medicinal properties of interest, standing out for their richness in phytochemical compounds. Research has shown high levels of flavonoids, giving them this antioxidant action, in addition to their antitumor potential. However, there is little knowledge about the benefits of phytochemicals that hops can provide to human health. Then, the extracts obtained by the cold extraction methods, by magnetic agitation and by ultrasound, were analyzed for their *in vitro* antioxidant capacity. The results of the DPPH tests showed that the extracts of the El Dorado and Ekuanot varieties, obtained by the cold extraction and ultrasound methods, presented greater antioxidant activity ($p < 0.05$), while the extract of the Hércules variety, extracted by magnetic agitation, demonstrated lower antioxidant activity. Similar results were obtained in the ABTS test. Regarding the quantification of total phenolic compounds, the Ekuanot variety (37.06 mg EAGg-1) in the ultrasound extraction presented the best result found. When analyzing the results obtained from the phosphomolybdenum complex and the reducing power, it was possible to establish a similarity between the two methods, highlighting the greater antioxidant activity in the Ekuanot extract, obtained by ultrasound extraction, and the lower antioxidant activity for the Hércules variety, extracted by magnetic agitation. Although the extracts demonstrated antioxidant activity in all analyses performed, the Ekuanot and Eldorado varieties showed greater antioxidant potential, and considering the extraction methodology, the ultrasonic wave extraction method stood out for providing the greatest extraction of the analyzed compound. Furthermore, the epithelial tumor test in *Drosophila melanogaster* showed the absence of carcinogenic effect of the three hop extracts obtained through the different methods. Likewise, inhibition of the formation of epithelial tumor clones in *D. melanogaster* and modulation of the carcinogenic effect of doxorubicin were verified in all three extracts. Through the same test, the protective activity of the extracts against the somatic cells of *D. melanogaster* was demonstrated.

Keywords: Bitter acids, Phenolic compounds, *Drosophila melanogaster*, Lupulin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cones do Lúpulo.....	17
Figura 2. Inflorescência feminina do lúpulo em corte transversal evidenciando a lupulina, pó resinoso amarelo.....	18
Figura 3. Estrutura dos α -ácidos e seus isômeros.....	20

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais constituintes em flores secas de lúpulo.....	19
Tabela 2. Concentração de α -ácidos das variedades de lúpulo utilizadas obtidas pelo fornecedor das amostras.....	21
Tabela 3. Espécies reativas de oxigênio e seus locais de ação.....	23
Tabela 4. Sistemas enzimáticos internos fundamentais.....	23

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

α	Alfa
AA%	Atividade antioxidante
ABTS	2,2-azinobis-3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico
β	Beta
BHT	Butil-hidroxitolueno
°C	Graus Celsius
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
Dra	Doutora
Dr	Doutor
&	Símbolo usado para substituir a conjunção aditiva "e"
EAG	Equivalentes de ácido Gálico
EBHT	Equivalentes de BHT <i>et al</i> Dolatin <i>et alii</i> - e outros; e colaboradores
Fe 2+	Ferro oxidado
Fe 3+	Ferro reduzido
FT	Fenólicos Totais
g	Grama
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrometro
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mmol	Milimol
Mo +5	Molibdênio reduzido
Mo +6	Molibdênio oxidado

nm	Nanômetro
pH	Potencial Hidrogeniônico
pKa	Constante de dissociação de ácido
%	Porcentagem
v/v	Volume por volume

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	14
1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Problema.....	15
1.2 Hipótese.....	15
1.3 Objetivos.....	16
1.3.1 Objetivo geral.....	16
1.3.2 Objetivos específicos.....	16
1.4. Justificativa.....	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1 <i>Humulus lupulus</i> e sua composição fitoquímica.....	17
2.2 Estresse oxidativo.....	22
2.3 Ação antioxidante.....	24
2.4 Metodologias para obtenção de extratos vegetais.....	25
2.5 Metodologias para análise de antioxidantes.....	26
2.6 Ação anticarcinogênica das plantas.....	28
2.7 <i>Drosophila melanogaster</i> como organismo teste na carcinogênese.....	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
CAPÍTULO 2.....	37
Análise comparativa da capacidade antioxidante de variedades de lúpulo ricos em α -ácidos utilizando diferentes técnicas de extração.....	39
CONCLUSÃO.....	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
Avaliação moduladora de três variedades de lúpulo frente a ação da doxorrubicina em células somáticas de <i>Drosophila melanogaster</i>	62
CONCLUSÃO	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80
ANEXOS.....	87

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

1.1 Problema

Ao longo da história da civilização humana, tanto nas práticas terapêuticas populares quanto nas formalmente reconhecidas, tem sido evidente o uso constante de espécies vegetais. Esse emprego sistemático permitiu ao homem iniciar uma extensa trajetória de aproveitamento dos recursos naturais em seu benefício (Santos, 2018a).

O *Humulus lupulus*, conhecido popularmente como lúpulo, pertencente à ordem Rosales e à família Cannabaceae, representado por dois gêneros a *Cannabis* e *Humulus*, conhecida por seu hábito trepadeiro, caráter perene e natureza dioica (Santos, 2020). O lúpulo, amplamente utilizado na indústria cervejeira, é uma trepadeira que produz flores, também chamadas de cones. Essas flores são de particular interesse, somente nelas são encontradas as glândulas de lupulina, responsáveis pela secreção de um pó amarelo resinoso, estes são ricos em resinas, polifenóis e óleos essenciais, que conferem características como aroma, amargor e propriedades antioxidantes (Durello; Silva; 2019).

As resinas macias são compostas por α -ácidos, β -ácidos e uma fração denominada resinas macias não caracterizadas. Essa última categoria engloba compostos que não se enquadram nas condições dos ácidos mencionados anteriormente, sendo subdividida em frações α e β (Silva *et al.*, 2022).

Os compostos fitoquímicos presentes no lúpulo são responsáveis por conferir à planta uma possível atividade antioxidante, que são capazes de estabilizar radicais livres (Schaeffer; Pereira, 2023). Estes radicais livres podem ocasionar o chamado estresse oxidativo, o qual ocorre devido ao desequilíbrio entre as defesas antioxidantes e a produção de espécies reacionais, levando a danos em diversas estruturas de biomoléculas presentes no organismo (Pizzino *et al.*, 2017).

1.2 Hipótese

O extrato do lúpulo pode desempenhar um papel relevante no combate ao estresse oxidativo celular, por conter substâncias antioxidantes como os α -ácidos, compostos fenólicos, xantohumol e óleos essenciais que demonstram atividade antioxidante.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antioxidante por meio de ensaios *in vitro* e a capacidade anticarcinogênica *in vivo* dos extratos de lúpulo.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Obter os extratos de três variedades do lúpulo, a partir de três métodos distintos de extração – à frio, agitação magnética e ultrassom;
- Avaliar *in vitro* a capacidade antioxidante dos extratos obtidos dos lúpulos 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.
- Avaliar *in vivo* o efeito carcinogênico e/ou anticarcinogênico, modulador e protetor dos extratos do lúpulo sobre os efeitos carcinogênicos da doxorrubicina.

1.4 Justificativa

Estudos destacam a relevância desses fitoquímicos para a saúde humana, uma vez que demonstram atividades anticarcinogênica, antimicrobiana, antitrombótica, imunomoduladora e antioxidante, sendo esta última considerada uma das propriedades mais significativas (Jaskula-Goiris *et al.*, 2014).

O lúpulo apresenta propriedades de interesse medicinais devido à sua riqueza em compostos fitoquímicos. Pesquisas evidenciaram altos níveis de flavonoides, conferindo-lhes ação antioxidante, além do potencial antitumoral. Essas características incluem proteção contra raios ultravioleta, insetos e micro-organismos, associadas a propriedades anticancerígenas, anti-inflamatórias, antitrombóticas, alelopáticas e inibidoras de enzimas (Medeiros, 2023).

Nesse contexto, o lúpulo pode desempenhar um papel importante, uma vez que representa uma fonte de antioxidantes. Entretanto, há poucos conhecimentos acerca dos benefícios dos fitoquímicos que existem no lúpulo podem proporcionar à saúde humana.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Humulus lupulus* e sua composição fitoquímica

O *Humulus lupulus*, conhecido como lúpulo (Figura 1), tem suas origens na China, mas ao longo do tempo adaptou-se e agora pode ser encontrado em diversas regiões de climas temperados ao redor do mundo (Zugravu *et al.*, 2022). Esta planta é notável entre as espécies vegetais devido às suas propriedades farmacológicas significativas. Pertence à ordem Rosales e à família Cannabaceae. O nome latino "lupulus" traduz-se como "pequeno lobo," uma referência à sua tendência de crescer e sufocar árvores, uma característica comum entre as plantas conhecidas como trepadeiras (Lela *et al.*, 2022).

Figura 1. Cones do Lúpulo.



Fonte: Science of Beer, 2020.

No Brasil, o cultivo do lúpulo tem se mostrado viável em várias regiões do país, com a produção principalmente direcionada para atender às demandas das indústrias cervejeiras. No contexto da produção de cerveja, é de extrema importância conhecer em detalhes a composição química das flores de lúpulo, especialmente em relação ao teor de seus constituintes, como resinas e óleos essenciais. Essa análise detalhada é fundamental para garantir a qualidade da

produção cervejeira, uma vez que as características do lúpulo, como seu amargor e aroma, desempenham um papel crítico na formulação e no sabor final das cervejas (Aquino *et al.*, 2022).

As inflorescências femininas do lúpulo, conhecidas como cones de lúpulo, são altamente valorizadas na indústria. Isso se deve ao fato de que esses cones contêm glândulas de lupulina (Figura 2), que abrigam uma série de compostos liberados na forma de um pó resinoso amarelo. Esses compostos desempenham um papel crucial na fabricação de cerveja, conferindo à bebida um sabor amargo e um aroma distintivo. Essas características contribuem significativamente para a qualidade e a variedade de sabores encontrados nas cervejas, melhorando suas características sensoriais e tornando o lúpulo um ingrediente essencial no processo de produção cervejeira (Lela *et al.*, 2022).

Figura 2. Inflorescência feminina do lúpulo em corte transversal evidenciando a lupulina, pó resinoso amarelo.



Fonte: Menina lupulina, 2018.

O formato mais comum para a comercialização do lúpulo é na forma de *pellets*, que são obtidos pela prensagem das pétalas das flores. Essa forma tem como objetivo reduzir o volume do lúpulo, tornando-o mais prático para transportar e preservando suas características originais. Essa apresentação em *pellets* facilita também o armazenamento do lúpulo, garantindo ao mesmo tempo a manutenção de suas propriedades essenciais, como o sabor e o aroma característicos (Fischer, 2021).

Na composição do lúpulo (Tabela 1), encontram-se resinas macias, que incluem os α -ácidos e β -ácidos. Esses compostos são representados, respectivamente, pela humulona e lupulona (Zanoli; Zavatti, 2008). Eles começam a ser produzidos no início da formação do cone de lúpulo e são acumulados ao longo do processo de maturação. Essas resinas desempenham

um papel fundamental na indústria, onde os α -ácidos contribuem para o amargor da cerveja, enquanto os β -ácidos estão relacionados ao aroma (Guimarães, 2021).

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
Cinzas	8
Água	10
Celulose/lignina	43

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

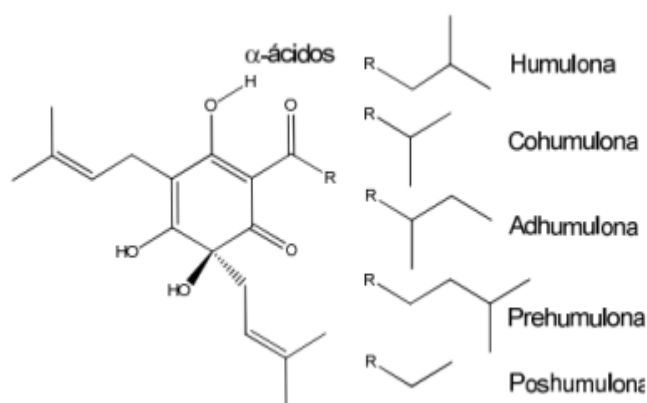
As características fitoquímicas do lúpulo são notavelmente complexas, e os metabólitos de interesse são produzidos principalmente pelas inflorescências (Fischer, 2021). A lupulina, uma parte significativa da resina do lúpulo, compreende de 15 a 30% do peso seco das inflorescências. Ela pode ser subdividida em duas categorias: resinas macias, que são solúveis em hexano, e resinas duras, que são insolúveis em hexano. A quantidade dessas resinas e dos óleos essenciais no lúpulo pode variar devido a uma série de fatores, como as condições de cultivo da planta, o manejo agrícola e outros (Bertelli *et al.*, 2018).

Além da composição das resinas, o lúpulo também apresenta uma variedade de polifenóis em sua composição. Esses polifenóis podem ser classificados em várias categorias, incluindo flavonóis (quercitina e o canferol), flavon-3-óleos (catequinas, epicatequinas e

proantocianidinas), ácidos carboxílicos fenólicos (ácido ferúlico) e ainda flavonoides prenil (xantohumol e o isoxantohumol) (Stevens; Page, 2004).

A humulona, um dos componentes dos α -ácidos, possui características de ácidos fracos, com um pKa (constante de dissociação) entre 4,0 e 5,5, e exibe baixa solubilidade em água. No entanto, quando submetida à isomerização em altas temperaturas, sua solubilidade tende a aumentar. Durante o processo de isomerização, cada molécula de humulona produz dois diastereoisômeros, conhecidos como cis-iso-humulona e trans-iso-humulona. Na Figura 1 estão representadas as estruturas moleculares dos α -ácidos e seus isômeros (Fischer, 2021).

Figura 3. Estrutura dos α -ácidos e seus isômeros.



Fonte: Fischer, 2021.

Os α -ácidos do lúpulo são compostos por várias substâncias, incluindo a humulona, cohumulona, adhumulona, prehumulona e poshumulona. Por outro lado, os β -ácidos são constituídos pela lupulona, cupulona, adupulona, prelupulona e poslupulona (Fischer, 2021). Os β -ácidos possuem uma estrutura similar aos α -ácidos, mas são consideravelmente menos solúveis em água, com um pKa entre 4,0 a 7,8. Essa diferença de solubilidade é atribuída à ausência de um grupo alcóolico terciário no anel aromático das lupulonas. Ao contrário das humulonas, os β -ácidos não sofrem isomerização em altas temperaturas. No entanto, eles podem passar por processos de oxidação ao longo do armazenamento dos cones de lúpulo (Skomra; Koziara-Ciupa, 2020).

As resinas classificadas como duras são insolúveis em hexano, mas apresentam solubilidade em metanol e éter dietílico, tornando-as mais polares em comparação com as resinas macias. A maioria das resinas duras surge como resultado da oxidação das resinas macias, principalmente quando o lúpulo é armazenado em contato com o oxigênio do ambiente (Taniguchi *et al.*, 2015).

Além das humulonas e lupulonas, a resina macia do lúpulo também inclui outros componentes, como as chalconas preniladas e as flavonas. O xantohumol é o constituinte principal entre os prenilflavonoides, juntamente com outras 13 chalconas relacionadas. Em geral, as chalconas têm uma hidroxila livre, o que permite a isomerização para formar as flavonas correspondentes, incluindo a iso-xantohumol, 6-prenilnaringenina e 8-prenilnaringenina (Nikolic; Van Breemen, 2013).

Na composição do lúpulo, além das resinas macias e duras, também existe uma pequena fração de óleo essencial, que geralmente varia de 0,5 a 3,0%. Essa fração de óleo essencial faz parte da constituição da lupulina. Os compostos encontrados no óleo essencial do lúpulo incluem hidrocarbonetos, compostos oxigenados e compostos que contêm enxofre (Fischer, 2021).

Ao explorar a composição fitoquímica do lúpulo, é crucial entender a diversidade de variedades disponíveis. O lúpulo é cultivado em diferentes regiões, resultando em uma ampla variedade de perfis de sabor e aroma. Existem mais de 30 variedades americanas e mais de 40 variedades europeias de lúpulo, cada uma com características únicas. Essas variedades são classificadas em três categorias: lúpulos de amargor, lúpulos de aroma e lúpulos com dupla aptidão (Spósito *et al.* 2019).

Os lúpulos de amargor em estudo (Tabela 2) apresentam em sua constituição os alfa ácidos e xanthohumol, que são os componentes predominantes nos cones dessa planta, e conforme a literatura, os ácidos amargos apresentam atividades farmacológicas de interesse, como: atividades anticâncer, antioxidante, anti-inflamatória, de inibição de peroxidação lipídica, anti-hiperglicêmica e contribuição no metabolismo dos lipídeos, já o xanthohumol, apresenta atividades anticâncer, antibacteriana, antioxidante, antiobesidade, antiviral, anti-inflamatória, anti-hiperglicêmica e antiplaquetária (Nascimento, 2023).

Tabela 2. Concentração de α -ácidos das variedades de lúpulo utilizadas obtidas pelo fornecedor das amostras.

Variedade	Origem	% α -ácidos
El dorado	Estados Unidos	15,7
Ekuanot	Estados Unidos	14,6
Hércules	Alemanha	14,4

Fonte: Elaboração própria.

2.2 Estresse oxidativo

Os radicais livres (RL) são átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados em sua última camada eletrônica, o que os torna altamente reativos e capazes de reagir com outras biomoléculas. Esses RL são gerados continuamente pelo organismo em diversas condições fisiológicas e fisiopatológicas. Eles são produzidos em processos como o metabolismo mitocondrial, a via do ácido úrico por meio da enzima xantina peroxidase, nos peroxissomos, durante estados inflamatórios, pela atividade de fagócitos, em situações de isquemia, em resposta a exercícios físicos intensos, em situações de estresse mental e como parte do processo de envelhecimento (Kumar; Pandey, 2015). Fatores externos também podem induzir a produção excessiva de RL no organismo. Tais fatores incluem o tabagismo, a exposição à poluição do ar, a radiação, o uso de certos medicamentos, a exposição a pesticidas, solventes industriais e outros poluentes ambientais (Guan; Lan, 2018).

Quando a produção de RL excede a capacidade do organismo de neutralizá-los, ocorre um estado chamado estresse oxidativo. Este processo é caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção de RL e a capacidade antioxidante do organismo. Pode-se resultar em danos às biomoléculas, incluindo proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, e uma série de alterações nas condições de saúde, como doenças cardiovasculares, câncer, doenças neurodegenerativas e envelhecimento precoce (Guan; Lan, 2018).

Esses RL podem ser produzidos por meio de espécies reativas de oxigênio (EROs), (Tabela 3), que incluem o radical superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxila (OH^-) e o oxigênio singlete ($^1O_2$). As EROs desempenham papéis importantes em diversos eventos celulares, como a fosforilação de proteínas e a ativação de fatores de transcrição. No entanto, é fundamental que suas concentrações sejam mantidas em níveis baixos para preservar a homeostasia e evitar danos às células e às biomoléculas (Silva *et al.*, 2022).

Tabela 3. Espécies reativas de oxigênio e seus locais de ação.

Espécies	Estrutura química	Descrição	Ocorrência	Ação Radical
Superóxido	$O_2^{\cdot-}$	Radical mais potente na indução de dano celular	Aproximadamente em todas as células aeróbicas	Na maioria das reações atua como agente redutor
Peróxido de hidrogênio	H_2O_2	Não é um radical livre, porque não possui elétrons desemparelhados na última camada	Reações para produção de $HO\cdot$	Proteínas e lipídios
Radical hidroxila	$HO\cdot$	Altamente reativo	Formado a partir da homólise da água	DNA, proteínas, carboidratos e lipídeos
Oxigênio singlete	$^1O_2$	Molécula de oxigênio excitada; não é um radical livre, porque não possui elétrons desemparelhados na última camada	Produzidos pelos fagócitos, indução luminosa e reações catalisadas pelas peroxidases	Mutações no DNA

Fonte: Adaptado Oliveira, Schoffen (2010).

As células contêm sistemas enzimáticos internos fundamentais (Tabela 4), como a superóxido dismutase, a catalase, a glutathiona peroxidase e redutase, que desempenham um papel crucial na defesa contra o estresse oxidativo. No entanto, quando ocorre um desequilíbrio no corpo e a produção de RL aumentam significativamente, esses sistemas enzimáticos podem se tornar insuficientes para conter o dano oxidativo às estruturas celulares vitais. Esses danos oxidativos podem ter consequências graves para a saúde celular e geral do organismo. De fato, o estresse oxidativo está intimamente relacionado a uma série de disfunções de saúde (Pizzino *et al.*, 2017).

Tabela 4. Sistemas enzimáticos internos fundamentais.

Enzimas	Ação Biológica	Locais
Superóxido dismutase	Catalisa a desmutação do $O_2^{\cdot-}$, convertendo-o em H_2O_2 , que é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas	Abundante nas células aeróbicas
Catalase	Catalisa a água e oxigênio para formação de H_2O_2	Eritrócitos e baço, rins dos mamíferos e fígado
Glutathiona peroxidase	Catalisa a redução do H_2O_2 e peróxidos orgânicos para o seu álcool correspondente, sendo que a glutathiona opera em ciclos entre a sua forma oxidada e a sua forma reduzida	Citosol
Glutathiona redutase	Mantém o sistema de proteção celular íntegro através da redução da forma oxidada (GSSG) para a forma reduzida (GSH)	Fígado e linfonodos

Fonte: Adaptado Oliveira, Schoffen (2010).

O dano oxidativo nos ácidos nucleicos desempenha um papel importante na iniciação do câncer. A patogênese do câncer pode ser impulsionada ou promovida por irregularidades cromossômicas e pela ativação da oncogênese devido ao estresse oxidativo. A hidrólise das bases do DNA é um resultado comum de subprodutos da oxidação e pode ser considerada um fator relevante na carcinogênese. Modificações que ocorrem no DNA, como lesões nas bases e no açúcar, ligações cruzadas entre o DNA e proteínas, quebras de fita em locais desprovidos de bases, podem contribuir para o desenvolvimento de tumores (Valko *et al.*, 2006).

2.3 Ação antioxidante

A atividade antioxidante de certos compostos tem despertado interesse crescente nos últimos tempos devido aos diversos benefícios que eles oferecem ao organismo. Esses compostos têm a capacidade de inibir ou retardar o surgimento de células tumorais, atrasar o envelhecimento precoce e prevenir danos celulares causados pelo desequilíbrio no estado REDOX, que envolve reações de oxidação e redução no organismo (Velloso *et al.*, 2021).

Substâncias que possuem mecanismos de ação antioxidante têm chamado atenção tanto na comunidade científica quanto na indústria. Compostos antioxidantes desempenham um papel crucial na fabricação de produtos cosméticos, farmacêuticos e alimentos. Eles não apenas atuam como agentes de conservação, mas também são matérias-primas de extrema importância na formulação desses produtos. Entre os compostos antioxidantes mais destacados estão o ácido ascórbico, conhecido como vitamina C, a vitamina E e a coenzima Q10. Além desses, os flavonoides também têm chamado a atenção devido à sua atividade biológica. Os flavonoides estão presentes em uma ampla variedade de alimentos, vegetais e outras fontes naturais, tornando-os componentes valiosos na promoção da saúde e na prevenção de danos causados pelo estresse oxidativo (Bravo, 1998).

A capacidade dos polifenóis de atuarem como antioxidantes está diretamente relacionada à sua estrutura química. Eles possuem grupos hidroxila em sua molécula, que interagem com os radicais livres, doando elétrons para neutralizá-los, tornando-os menos reativos e, assim, impedindo que eles causem danos às biomoléculas do organismo. Essa capacidade de neutralização é fundamental para o papel antioxidante dos polifenóis e para a proteção das células contra os efeitos prejudiciais do estresse oxidativo, pois o radical que antes estava livre, não estará disponível para reagir com biomoléculas do organismo (Elrod *et al.*, 2019).

Os óleos essenciais do lúpulo têm atividade antioxidante, porém, geralmente são menos eficazes em comparação com os polifenóis encontrados na planta. Algumas substâncias presentes nos óleos essenciais, como o linalol e o ácido lipoico, demonstraram capacidade de neutralizar a peroxidação lipídica, embora em comparação com a vitamina E, seus efeitos antioxidantes sejam menores (Hussain *et al.*, 2008). Além disso, o composto mirceno demonstrou a capacidade de proteger as células de ratos contra a oxidação, promovendo o aumento da atividade de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase e a glutathione peroxidase. Também, os sesquiterpenos, com destaque para o β -cariofileno, exibiram atividade de proteção contra a oxidação lipídica (Karabin *et al.*, 2015). Assim, fica evidente que os óleos essenciais do lúpulo também desempenham um papel importante na atividade antioxidante dessa planta (Fischer, 2021).

Com sua rica composição em polifenóis, o lúpulo demonstra ser uma fonte eficaz na luta contra o estresse oxidativo causado pelos RL, exercendo uma atividade antioxidante notável. Esses polifenóis, ao serem oxidados, protegem as estruturas circundantes dos danos causados pelos RL (Krofta; Mikyska; Hasková, 2008).

2.4 Metodologias para obtenção de extratos vegetais

A extração é um processo de separação amplamente utilizado em diversos setores industriais, incluindo farmacêutico, alimentício, químico, de perfumaria, cosmético e de biocombustíveis. Além das aplicações industriais, as técnicas de extração desempenham um papel fundamental em escala laboratorial, especialmente na preparação de amostras para análises fitoquímicas, configurando-se como uma etapa essencial no processo (Fischer, 2021).

Existem diversos métodos para a obtenção de extratos de origem vegetal, tais como maceração, infusão, percolação, decocção, extração contínua a quente (Soxhlet), contracorrente, ultrassom, micro-ondas, turbólise, entre outros. A escolha do método de extração é influenciada por fatores como a parte do material vegetal utilizada, o tamanho das partículas, os tipos de solventes, o tempo, a temperatura, a polaridade e a concentração do solvente (Oliveira *et al.*, 2016).

A técnica de extração por ultrassom, por exemplo, utiliza ondas de alta frequência, geralmente na faixa de 20 a 40 quilohertz (KHz). Essas ondas criam vibrações que causam variações na pressão do líquido extrator, levando ao fenômeno conhecido como cavitação, que fragmenta e erode o material da amostra, facilitando a extração de compostos (Santos, 2018b;

Ferreira *et al.*, 2011). Uma evolução dessa técnica é a extração assistida por ultrassom (UAE), que aumenta ainda mais a eficiência do processo, reduzindo o tempo de extração e o consumo de solventes, enquanto aumenta o rendimento dos extratos. A UAE é especialmente vantajosa para compostos sensíveis ao calor e é amplamente utilizada tanto em pesquisas fitoquímicas quanto na produção industrial de extratos (Kumar; Srivastav; Sharanagat, 2021; Carreira-Casais *et al.*, 2021).

Apesar da eficácia das técnicas tradicionais, outras metodologias modernas e amplamente aplicadas têm se destacado, oferecendo vantagens distintas e sendo adaptáveis às necessidades específicas dos processos e dos compostos-alvo. A extração com solventes orgânicos, por exemplo, é amplamente utilizada devido à sua eficácia em isolar compostos bioativos (Awad *et al.*, 2021). Solventes como etanol, metanol e acetona são comuns, e a escolha do solvente é fundamental para a eficiência e a composição final do extrato, sendo aplicável tanto em escala laboratorial quanto industrial (Zhang; Lin; Ye, 2018).

Além disso, a extração assistida por micro-ondas (MAE) se destaca como uma técnica moderna que aquece rapidamente o solvente e a matriz vegetal, resultando em uma extração mais eficiente em menos tempo. A MAE preserva compostos termolábeis e é amplamente utilizada em pesquisas fitoquímicas devido ao seu alto rendimento (Soria *et al.*, 2012; Gil-Martín *et al.*, 2022). Outro método avançado é a extração com fluidos supercríticos (SFE), que utiliza fluidos como o dióxido de carbono (CO₂) em condições supercríticas para extrair compostos bioativos sem deixar resíduos de solventes (Herzyk; Piłakowska-Pietras; Korzeniowska, 2024). Este método é ideal para compostos sensíveis ao calor e é valorizado por sua sustentabilidade, sendo amplamente utilizado nas indústrias farmacêutica e alimentícia (Uwineza; Waśkiewicz, 2020).

Por fim, a extração com enzimas é uma técnica mais recente que emprega enzimas para quebrar as paredes celulares das plantas, facilitando a liberação de compostos bioativos. Este método é atraente por ser mais suave, específico e sustentável, resultando em extratos de alta qualidade com menor degradação dos compostos ativos (Puzerytė *et al.*, 2023).

2.5 Metodologias para análise de antioxidantes

Na literatura, existem várias técnicas disponíveis para detectar e quantificar a atividade antioxidante de compostos. Uma dessas técnicas é a espectroscopia, que permite aos compostos com ação antioxidante interagir com radicais livres, resultando na formação de estruturas com características espectroscópicas específicas, como cores em regiões específicas do espectro.

Essas mudanças espectroscópicas podem ser medidas e analisadas para avaliar a atividade antioxidante dos compostos (Silva *et al.*, 2022).

Entre as análises espectroscópicas amplamente utilizadas para avaliar a atividade antioxidante de compostos, destacam-se o DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), ABTS (Ácido 2,2-Azino-Bis (3-Etilbenzotiazolina-6-Sulfônico) Sal Diamônico), FRAP (Poder redutor do ferro) e CUPRAC (Capacidade antioxidante de redução do íon cobre). Esses ensaios possuem um caráter colorimétrico e são realizados em diferentes solventes, proporcionando uma abordagem abrangente para a avaliação da atividade antioxidante de substâncias, como o lúpulo (Ojha *et al.*, 2018).

O ensaio do DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) baseia-se no uso do radical DPPH, que é um arranjo estável devido aos três anéis aromáticos que o compõem. Esses anéis permitem a ressonância necessária para estabilizar a carga eletrônica do radical, resultando na sua coloração púrpura-violeta na faixa de 515 a 520 nanômetros, quando em solução de metanol ou etanol. Substâncias com propriedades antioxidantes têm a capacidade de doar um átomo de hidrogênio ou um elétron para o radical DPPH, convertendo-o em sua forma reduzida. Esse processo leva a uma mudança na cor da solução, que passa de violeta para amarelo, devido à redução do radical, e essa diminuição na absorção é medida por espectrofotometria, fornecendo informações sobre a capacidade antioxidante do composto em questão (Silva *et al.*, 2022; Ojha *et al.*, 2018).

O ensaio ABTS (Ácido 2,2-Azino-Bis (3-Etilbenzotiazolina-6-Sulfônico) Sal Diamônico) envolve o uso do radical ABTS, que é um composto cromóforo estável com absorção primária em 414 nanômetros e absorção secundária em 645, 734 e 815 nanômetros em solução aquosa. Na presença de antioxidantes, ocorre a redução do radical ABTS, resultando em uma diminuição na absorbância ao longo do tempo. Essas mudanças na absorbância são medidas por espectrofotometria e podem ser plotadas em gráficos. O cátion ABTS possui uma coloração azul-esverdeada, e a atividade antioxidante provoca a sua redução, resultando na perda de cor. Esse método permite avaliar a capacidade antioxidante de substâncias em extratos, sejam eles hidrossolúveis ou lipossolúveis, comparando a porcentagem de inibição do radical ABTS por antioxidantes sintéticos ou compostos presentes em plantas, sob as mesmas condições (Sucupira *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2022).

Outra técnica utilizada é o método da formação do complexo fosfomolibdênio, uma técnica colorimétrica usada para avaliar a atividade antioxidante de extratos vegetais. O princípio desse método envolve a redução do molibdênio no estado +6 para o estado +5 por meio de compostos antioxidantes. Isso resulta na formação de um complexo fosfato/molibdênio

+5 de cor verde, que ocorre em um ambiente ácido. A leitura desse método é realizada em um espectrofotômetro a 695 nanômetros e pode ser comparada com uma amostra em branco previamente estabelecida para fins de comparação com a capacidade antioxidante do extrato (Prieto *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2022).

O método do Poder Redutor é uma técnica que avalia a capacidade de um composto em aumentar a absorbância em ensaios antioxidantes. Nesse método, os antioxidantes presentes na amostra reagem com um sistema composto por ferrocianeto de potássio, ácido tricloroacético e cloreto de ferro, resultando na formação de complexos coloridos com uma absorbância medida a 700 nanômetros. A magnitude do aumento na absorbância devido à reação dos antioxidantes da amostra com o sistema, reflete a atividade antioxidante do composto. Portanto, quanto maior a absorbância, maior é o poder redutor do composto. Esse método é analisado em um espectrofotômetro e comparado com uma amostra de referência previamente estabelecida (Silva *et al.*, 2022).

Já para determinar o teor de fenólicos totais, o método de Folin-Ciocalteu possui uma resposta colorimétrica à interação com substâncias redutoras presentes no analito de interesse. O reagente é composto por ácido fosfotúngstico e ácido fosfomolibdico que, em seu estado natural, apresenta uma coloração amarela. No entanto, quando entra em contato com substâncias redutoras, como os compostos fenólicos, ocorre uma reação em que essas substâncias, em pH alcalino, dissociam um próton, formando o ânion fenolato. Esse ânion fenolato tem a capacidade de reduzir o reagente Folin-Ciocalteu, resultando na formação de óxido de tungstênio e óxido de molibdênio, ambos com uma cor azul detectável em um espectrofotômetro a 760 nanômetros. Assim, quanto maior a atividade antioxidante da amostra, mais intensa será a coloração azul formada, indicando uma maior quantidade de substâncias redutoras e fenólicas presentes. No entanto, é importante destacar que o reagente Folin-Ciocalteu não é específico para grupos fenólicos, ou seja, outras substâncias redutoras presentes na amostra podem interferir no resultado (Silva *et al.*, 2022; Pires *et al.*, 2017).

2.6 Ação anticarcinogênica do lúpulo

O câncer é uma enfermidade grave que se caracteriza pela proliferação anormal e descontrolada das células no organismo, sendo uma das principais causas de morte em todo o mundo. Esse processo é desencadeado por lesões genéticas que afetam quatro categorias de genes: proto-oncogenes, que promovem o crescimento celular; genes supressores de tumores, que inibem esse crescimento; genes reguladores de apoptose, responsáveis pela morte celular

programada; e genes de reparo do DNA (Dornelas; Moraes-Filho, 2016). Os RL também contribuem para a desordem na multiplicação celular, podendo levar ao desenvolvimento do câncer (Bontempo; Orsolin, 2017).

Aproximadamente 70% da população global utiliza plantas medicinais em algum momento de suas vidas, prática que tem ganhado destaque devido à presença de moléculas bioativas com potencial anticancerígeno. Muitas dessas plantas demonstraram eficácia não apenas na prevenção do câncer, mas também na regressão de tumores malignos (Libório; Felipe; Bido, 2019). A atividade anticancerígena das plantas é frequentemente atribuída aos altos níveis de compostos antioxidantes (Netzel *et al.*, 2007). Desse modo, produtos de origem vegetal podem desempenhar um papel significativo na terapia do câncer, além de oferecer uma base promissora para o desenvolvimento de novos medicamentos (Oyenih; Smith, 2019).

A administração combinada de drogas antineoplásicas e antioxidantes tem demonstrado benefícios no tratamento do câncer. Essas substâncias desempenham um papel fundamental na proteção celular, inibindo a oxidação de substratos causada pelos RL (Sousa *et al.*, 2007). Dentre as plantas estudadas, o lúpulo contém diversos constituintes com propriedades anticarcinogênicas, sendo o xantohumulol um dos mais investigados. Este flavonoide interfere em múltiplas vias moleculares associadas ao desenvolvimento do câncer, incluindo a modulação do ciclo celular, a supressão da angiogênese e a neutralização de radicais livres, tornando-o um potencial agente quimiopreventivo. O xantohumulol tem demonstrado a capacidade de inibir a proliferação de células cancerosas e induzir apoptose, destacando-se como um composto promissor para o tratamento de diversos tipos de câncer (Karabin *et al.*, 2015; Qi *et al.*, 2022).

Além do xantohumulol, outros compostos do lúpulo, como as humulonas e lupulonas, principais ácidos amargos dessa planta, também apresentam atividades antitumorais significativas. Estes compostos estão associados à inibição do crescimento de células tumorais, indução de apoptose e redução da inflamação, um fator-chave na progressão do câncer (Machado *et al.*, 2017; Jiang *et al.*, 2018).

Outro composto relevante é a 8-prenilnaringenina, um fitoestrógeno presente no lúpulo. Embora existam preocupações quanto ao risco potencial de promover certos tipos de câncer, como o de mama, há evidências de que, em alguns contextos, a 8-prenilnaringenina pode exercer efeitos anticarcinogênicos ao modular a atividade dos receptores de estrogênio e influenciar o comportamento das células tumorais (Sun *et al.*, 2022; Knez Hrncić *et al.*, 2019).

2.7 *Drosophila melanogaster* como organismo teste na carcinogênese

A compreensão dos tumores que afetam os seres humanos envolve uma série de alterações genéticas, desde a inativação dos genes supressores de tumores até o desencadeamento da oncogênese. Notavelmente, ao considerar o processo evolutivo, observa-se uma alta homologia genética entre os seres humanos e a *Drosophila melanogaster*. Portanto, o estudo da indução e da proliferação de tumores em moscas fornece uma plataforma valiosa para a compreensão do surgimento do câncer em seres humanos (Lima *et al.*, 2018).

Os discos imaginais das *D. melanogaster* são compostos por uma única camada celular que, durante a metamorfose, dará origem às estruturas epidérmicas nas moscas adultas. Notavelmente, essas células apresentam semelhanças com o ciclo celular das células somáticas dos mamíferos. Um gene conhecido como "gene da verruga" (*wts*), que desempenha um papel crucial no controle do ciclo celular no disco imaginal, atua como um supressor tumoral. Ele regula a multiplicação celular e, conseqüentemente, a morfogênese normal das estruturas em desenvolvimento (Costa *et al.*, 2011).

O marcador genético *wts* é uma mutação de natureza recessiva e letal quando presente em homozigose, o que significa que os indivíduos que possuem duas cópias desse alelo não sobrevivem. No entanto, o alelo warts (*wts*) é mantido na linhagem de estoque por meio de um balanceador cromossômico, conhecido como TM3. Isso permite a sobrevivência dos indivíduos heterozigotos que carregam uma cópia do alelo *wts* em combinação com uma cópia normal (*wts*/+). Em cruzamentos envolvendo linhagens com o alelo *wts*, como *wts*/TM3, e linhagens com outros marcadores genéticos, como múltiplos pêlos alares (*mwh*/*mwh*), podem nascer larvas heterozigotas que carregam tanto o alelo *wts* quanto o marcador *mwh* (*wts*/+*mwh*) (Sidorov *et al.*, 2001).

A inibição ou incapacidade das cópias do gene *wts*, que codificam uma proteína quinase sensível à serina ou treonina, desencadeia um desequilíbrio na taxa de divisão celular durante o desenvolvimento dos discos imaginais. Essa alteração genética está associada ao aparecimento de tumores quando ocorre a perda do gene em sua forma funcional. Portanto, esses achados fundamentam a hipótese de que o gene *wts* desempenha o papel de um supressor tumoral, e essa supressão genética é um fator contribuinte para o surgimento de tumores, especialmente quando ocorre a perda da heterozigose do gene (Costa *et al.*, 2011).

O emprego de *D. melanogaster* heterozigota para o gene supressor tumoral *wts* configura-se como uma ferramenta crucial na avaliação do impacto dos extratos de plantas. Isso

possibilita a análise do potencial antioxidante de compostos na prevenção de tumores epiteliais nesse modelo experimental.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

ASTRAY, G. *et al.* *Humulus lupulus* L. as a natural source of functional biomolecules. **Applied Sciences**, v. 10, n. 15, p. 5074, 2020.

AWAD, A. M.; KUMAR, P.; ISMAIL-FITRY, M. R. *et al.* Green Extraction of Bioactive Compounds from Plant Biomass and Their Application in Meat as Natural Antioxidant. **Antioxidants**, v. 10, n. 9, p. 1465, 2021.

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.

BONTEMPO, N. J. S.; ORSOLIN, P. Efeito anticarcinogênico do Gerioox® em *Drosophila melanogaster*. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.14 n.26; p. 318-327, 2017.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

CARREIRA-CASAS, A.; OTERO, P.; GARCIA-PEREZ, P. *et al.* Benefits and Drawbacks of Ultrasound-Assisted Extraction for the Recovery of Bioactive Compounds from Marine Algae. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 17, p. 9153, 2021.

COSTA, W. F. *et al.* Lapachol como agente inibidor de tumor epitelial em heterozigoto de *Drosophila melanogaster* para o gene supressor tumoral *wts*. **Genet. Mol. Res.** v.10, n. 4, p. 3236-3245, 2011.

DORNELAS, C. A.; MORAES FILHO, M. O. Carcinogênese experimental de bexiga e o índice de carcinogênese. **E-book**. Fortaleza: Imprensa Universitária, p. 182, 2016. Acesso em: 15 out. 2023. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/19467>.

DURELLO, R. S.; SILVA, L. M.; BOGUSZ, S. Química do lúpulo. **Química Nova**, v. 42, p. 900-919, 2019.

ELROD, S. M. *et al.* Relationship between Phenolic and Antioxidant Concentration of *Humulus lupulus* and Alpha Acid Content. **Journal Of The American Society Of Brewing Chemists**, v. 77, n. 2, p. 134-139, 3 abr. 2019.

FERREIRA, R. H. *et al.* Inovação na fabricação de cervejas especiais na região de Belo Horizonte. **Perspectivas em Ciência da Informação**, [S.L.], v. 16, n. 4, p. 171-191, 2011.

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.

GIL-MARTÍN, E.; FORBES-HERNÁNDEZ, T.; ROMERO, A. *et al.* Influence of the extraction method on the recovery of bioactive phenolic compounds from food industry by-products. **Food Chemistry**, v. 378, p. 131918, 2022.

GUAN, G.; LAN, S. Implications of Antioxidant Systems in Inflammatory Bowel Disease. **BioMed Research International**. 2018.

GUIMARÃES, B. P. **Avaliação do lúpulo (*Humulus lupulus* L.) cultivado no Distrito Federal para uso cervejeiro**. Dissertação (mestrado), Instituto de Química Programa de Pós-Graduação em Química. Brasília, 2021.

HERZYK, F.; PIŁAKOWSKA-PIETRAS, D.; KORZENIOWSKA, M. Supercritical Extraction Techniques for Obtaining Biologically Active Substances from a Variety of Plant Byproducts. **Foods**, v. 13, n. 11, p. 1713–1713, 2024.

HUSSAIN, A. I. *et al.* Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. **Food Chem.** v. 108, n. 3, p. 986–995, 2008.

JASKULA-GOIRIS, B. *et al.* The Use of Hop Polyphenols during Brewing to Improve Flavor Quality and Stability of Pilsner Beer. **Journal Of The American Society Of Brewing Chemists**, [S.L.], v. 72, n. 3, p. 175-183, 2014.

JIANG, C. H.; SUN, T. L.; XIANG, D. X. *et al.* Anticancer Activity and Mechanism of Xanthohumol: A Prenylated Flavonoid From Hops (*Humulus lupulus* L.). **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, 2018.

KARABIN, Marcel *et al.* Biotransformations and biological activities of hop flavonoids. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 6, p. 1063-1090, 2015.

KNEZ HRNČIČ, M. *et al.* Hop Compounds: Extraction Techniques, Chemical Analyses, Antioxidative, Antimicrobial, and Anticarcinogenic Effects. **Nutrients**, v. 11, n. 2, p. 257, 2019.

KROFTA, K. *et al.* Antioxidant Characteristics of Hops and Hop Products. **Journal Of The Institute Of Brewing**, [S.L.], v. 114, n. 2, p. 160-166, 2008.

KUMAR, K.; SRIVASTAV, S.; SHARANAGAT, V. S. Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 70, p. 105325, 2021.

KUMAR S.; PANDEY, A. K. Free Radicals: Health Implications and their Mitigation by Herbs. **Journal of Advances in Medicine and Medical Research**, v. 7, n. 6, p. 438-457, 2015.

LELA, L. *et al.* Nanotechnological exploitation of the antioxidant potential of *Humulus lupulus* L. extract. **Food Chemistry**, p. 133401, 2022.

LIBÓRIO, F. H. D. M.; FELIPE, D. F.; BIDO, G. D. S. **Plantas medicinais e seu potencial anticarcinogênico**. XI EPCC - Encontro Internacional de Produção Científica, 2019.

LIMA, P. M. A. P. *et al.* Effects of a carbonated soft drink on epithelial tumor incidence in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 6, p. 240-247, 2018.

MACHADO, J. C.; FARIA, M. A.; MELO, A. *et al.* Antiproliferative effect of beer and hop compounds against human colorectal adenocarcinoma Caco-2 cells. **Journal of Functional Foods**, v. 36, p. 255–261, 2017.

MEDEIROS, L. F. C. **Formulação de protetor solar natural a partir da incorporação do extrato da folha de *Humulus lupulus***. Monografia (Graduação em Farmácia) - Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2023.

MENINA LUPULINA - **Água, Malte, Lúpulo e Conteúdo**. 23 de outubro de 2018.
Disponível em: <<https://meninalupulina.blogspot.com/>> Acesso em: 25 fevereiro 2024.

MOURATIDIS, P. X. E. *et al.* An investigation into the anticancer effects and mechanism of action of hop β -acid lupulone and its natural and synthetic derivatives in prostate cancer cells. **Nutr. Cancer**, v. 65, n. 7, 1086–1092, 2013.

NASCIMENTO, F. M. G. **Principais constituintes de flores de lúpulo: análise do potencial antioxidante e para o tratamento de gota, diabetes do tipo 2 e doença de Alzheimer**. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza 2023.

NETZEL, M. *et al.* Cancer cell antiproliferation activity and metabolism of black carrot anthocyanins. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.8, p.365-372, 2007.

NIKOLIC, D.; VAN BREEMEN, R. B. Analytical methods for quantitation of prenylated flavonoids from hops. **Current analytical chemistry**, v. 9, n. 1, p. 71-85, 2013.

OJHA, K. *et al.* A review on different methods of determination of antioxidant activity assay of herbal plants. **Research Journal of Life Sciences, Bioinformatics, Pharmaceutic and Chemical Sciences**, Bilaspur, v. 6, n. 4, p. 707-730, 2018.

OLIVEIRA, M. C.; SCHOFFEN, J. P. F. Oxidative stress action in cellular aging. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 6, p. 1333-1342, 2010.

OLIVEIRA, V. B. *et al.* Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por clac-dad de *Dicksonia sellowiana* (presl.). Hook, dicksoniaceae. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 18, p. 230-239, 2016.

OYENIHI, A. B.; SMITH, C. Are polyphenol antioxidants at the root of medicinal plant anticancer success? **Journal of Ethnopharmacology**. v. 229, p. 54-72, 2019.

PALANISAMY, R. *et al.* Synergistic Anticancer Activity of Plumbagin and Xanthohumol Combination on Pancreatic Cancer Models. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 25, n. 4, p. 2340, 2024.

PIRES, J. S. *et al.* Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu para extratos de algas. **Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo**, p. 1-5, set. 2017.

PIZZINO, G. *et al.* Oxidative Stress: harms and benefits for human health. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, [S.L.], v. 2017, p. 1-13, 2017.

PRIETO, P. *et al.* Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, [S.L.], v. 269, n. 2, p. 337-341, 1999.

PUZERYTÊ, V.; MARTUSEVICE, P.; SOUSA, S. *et al.* Optimization of Enzyme-Assisted Extraction of Bioactive Compounds from Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) Leaves: Evaluation of Mixed-Culture Fermentation. **Microorganisms**, v. 11, n. 9, p. 2180–2180, 2023.

QI, X. *et al.* Antioxidants in brain tumors: current therapeutic significance and future prospects. **Molecular Cancer**, v. 21, n. 1, 2022.

SANTOS, F. C. Variabilidade fenotípica de alfa ácido de lúpulo (*Humulus Lupulus* L) cultivados nas regiões do Brasil. Tese de Doutorado - Universidade do Estado de Santa Catarina. 2020.

SANTOS, T. A. **Avaliação de Diferentes Métodos e Solventes de Extração Sobre a Composição Fenólica e Centesimal, Atividade Antimicrobiana e Citotóxica de Extratos dos Frutos da *Momordica charantia* L.** Monografia (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal de Sergipe, Lagarto, p. 83, 2018 a.

SANTOS, V. A. **Estudo fitoquímico e atividade antioxidante do extrato e frações das folhas *Humulus lupulus* (Cannabaceae).** Monografia (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal de Ouro Preto, p. 14, 2018 b.

SCHAEFFER, G.; PEREIRA, G. G. **Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* das variedades de lúpulo Cascade e Teamaker cultivados no Brasil.** Instituto Federal do Espírito Santo, 2023.

SCIENCE OF BEER. **Lúpulo: um olhar químico sobre a planta e sua aplicação na cerveja.** 29 de janeiro 2020. Disponível em: <Lúpulo: um olhar químico sobre a planta e sua aplicação na cerveja (scienceofbeer.com.br)> Acesso em: 25 fevereiro 2024.

SIDOROV, R. A. *et al.* Induction of tumor clones in *D. melanogaster* wts/+ heterozygotes with chemical carcinogens. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 498, n. 1-2, p. 181-191, 2001.

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.

SKOMRA, U.; KOZIARA-CIUPA, M. Stability of the hop bitter acids during long-term storage of cones with different maturity degree. **Polish Journal of Agronomy**, v. 40, p. 16-24, 2020.

SPÓSITO, M. B. *et al.* **A cultura do lúpulo**. Piracicaba: ESALQ - Divisão de Biblioteca, n. 68, 81 p. 2019.

SORIA, A.C. *et al.* Sample Preparation for the Determination of Carbohydrates in Food and Beverages. **Comprehensive Sampling and Sample Preparation**, v. 4, p. 213–243, 2012.

SOUSA, C. M. *et al.* Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química nova**, v.30, n.2, p. 351-355, 2007.

SPÓSITO, M. B. *et al.* **A cultura do lúpulo**. Piracicaba: ESALQ - Divisão de Biblioteca, n. 68, 81 p. 2019.

STEVENS, J. F.; PAGE, J. E. Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health! **Phytochemistry**. v. 65, n. 10, p. 1317-1330, 2004.

SUCUPIRA, N. R. *et al.* Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. **Journal of Health Sciences**, v. 14, n. 4, 2012.

SUN, S. *et al.* Chemical constituents and bioactivities of hops (*Humulus lupulus* L.) and their effects on beer-related microorganisms. **Food and Energy Security**, v. 11, n. 2, 2022.

TANIGUCHI, Y. *et al.* Analysis of the components of hard resin in hops (*Humulus lupulus* L.) and structural elucidation of their transformation products formed during the brewing process. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 47, p. 11602-11612, 2014.

UWINEZA, P. A.; WAŚKIEWICZ, A. Recent Advances in Supercritical Fluid Extraction of Natural Bioactive Compounds from Natural Plant Materials. **Molecules**, v. 25, n. 17, p. 3847, 2020.

VALKO, M. *et al.* Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced câncer. **Chem Biol Interact.** v. 160, n. 1, p. 1-40, 2006.

VELLOSA, J. C. R. *et al.* E. Oxidative stress: an introduction to the state of the art. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 1, p 10152-10168, 2021.

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

ZHANG, Q. W.; LIN, L. G.; YE, W. C. Techniques for Extraction and Isolation of Natural products: a Comprehensive Review. **Chinese Medicine**, v. 13, n. 1, 2018.

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.

CAPÍTULO 2

**ARTIGO 1 – ANÁLISE COMPARATIVA DA CAPACIDADE
ANTIOXIDANTE DE VARIEDADES DE LÚPULO RICOS EM α -
ÁCIDOS UTILIZANDO DIFERENTES TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO**

ANÁLISE COMPARATIVA DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE VARIEDADES DE LÚPULO RICOS EM α -ÁCIDOS UTILIZANDO DIFERENTES TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE ANTIOXIDANT CAPACITY OF HOP VARIETIES RICH IN α -ACIDS USING DIFFERENT EXTRACTION TECHNIQUES

Bruna Cássia da Silva Teixeira

Mestranda em Biotecnologia

Instituto de Biotecnologia - Universidade Federal de Uberlândia
Rua Vereador Chico Filgueira, 33 - Sala 319 - Bloco Alfa UNIPAM
Campus Patos de Minas
brunacassia@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

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

RESUMO: A fitoterapia tem se consolidado como uma opção na medicina integrativa, oferecendo uma alternativa aos medicamentos sintéticos, que por vezes implicam em altos custos de desenvolvimento. As substâncias bioativas encontradas no lúpulo atraem crescente atenção no meio científico devido às suas atividades significativas, especialmente em patologias relacionadas a doenças degenerativas e crônicas, nas quais os processos oxidativos desempenham um papel central. Os alfa-ácidos, encontrados no lúpulo, tem evidenciado propriedades benéficas para a saúde, ou seja, possuem ampla aplicação para fins terapêuticos. Este estudo objetivou avaliar a capacidade antioxidante *in vitro* a de extratos obtidos a partir de três variedades de lúpulo ricos em α -ácidos (El dorado, Ekuanot e Hércules). Para isto, foi utilizado a água como solvente e três métodos de extração: agitação magnética, ultrassom e extração à frio. A avaliação dos antioxidantes *in vitro* dos extratos pelo método DPPH mostrou que os maiores resultados encontrados estatisticamente, independente da concentração, foram pelos extratos da variedade El dorado e Ekuanot, nos métodos à frio e ultrassom, e os menores resultados foram vistos pelo extrato Hércules, pela agitação magnética; e semelhantermente ocorreu no teste de ABTS. Já os compostos fenólicos totais, temos a variedade Ekuanot na extração por Ultrassom como o melhor resultado encontrado. Os resultados obtidos do complexo fosfomolibdênio e do poder redutor, possibilitou estabelecer uma similaridade entre os resultados. Destaca-se que o maior resultado obtido para ambos os testes, da redução do complexo fosfomolibdênio e poder redutor foram pelo extrato Ekuanot, proveniente da extração por ultrassom, e o menor resultado obtido da redução do complexo fosfomolibdênio e do poder

reduzido foi o da variedade Hércules por agitação magnética. Embora os extratos tenham demonstrado atividade antioxidante em todas as análises realizadas, as variedades Ekuanot e Eldorado se destacaram de maneira positiva e considerando a metodologia de extração, o método extrativo por ondas ultrassônicas se destacou por proporcionar a maior extração do composto analisado.

Palavras chave: Alfa-ácidos, DPPH, ABTS, Fenólicos, Fitoterapia.

ABSTRACT: Phytotherapy has become an option in integrative medicine, offering an alternative to synthetic drugs, which sometimes involve high development costs. The bioactive substances found in hops have attracted increasing attention in the scientific community due to their significant activities, especially in pathologies related to degenerative and chronic diseases, in which oxidative processes play a central role. Alpha acids, found in hops, have shown beneficial properties for health, that is, they have wide application for therapeutic purposes. This study aimed to evaluate the in vitro antioxidant capacity of extracts obtained from three varieties of hops rich in α -acids (El Dorado, Ekuanot and Hércules). For this purpose, water was used as a solvent and three extraction methods were used: magnetic stirring, ultrasound and cold extraction. The evaluation of the in vitro antioxidants of the extracts by the DPPH method showed that the highest results found statistically, regardless of the concentration, were for the extracts of the El Dorado and Ekuanot varieties, in the cold and ultrasound methods, and the lowest results were seen for the Hercules extract, by magnetic agitation; and similarly occurred in the ABTS test. As for the total phenolic compounds, we have the Ekuanot variety in the ultrasound extraction as the best result found. The results obtained for the phosphomolybdenum complex and the reducing power, made it possible to establish a similarity between the results. It is noteworthy that the highest result obtained for both tests, the reduction of the phosphomolybdenum complex and the reducing power, were by the Ekuanot extract, from the ultrasound extraction, and the lowest result obtained for the reduction of the phosphomolybdenum complex and the reducing power was that of the Hercules variety by magnetic agitation. Although the extracts demonstrated antioxidant activity in all analyses performed, the Ekuanot and Eldorado varieties stood out positively and considering the extraction methodology, the extraction method using ultrasonic waves stood out for providing the greatest extraction of the compound analyzed.

Keywords: Alpha-acids, DPPH, ABTS, Phenolics, Phytotherapy.

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, as plantas consideradas medicinais são amplamente utilizadas devido à rica biodiversidade do seu território. A fitoterapia tem se consolidado como uma opção na medicina integrativa, oferecendo uma alternativa aos medicamentos sintéticos, que por vezes implicam em altos custos de desenvolvimento. Essa tendência é ampliada pela gama de ambientes propícios à flora, reflexo da riqueza da biodiversidade do país (Nobrega *et al.*, 2022).

O lúpulo, cientificamente conhecido como *Humulus lupulus*, pertencente à família *Cannabaceae*, é uma planta vastamente distribuída em regiões temperadas e tem uma longa

história de uso medicinal na Europa e por isso tem despertado atenção em todo o mundo devido à sua riqueza em diversos compostos fitoquímicos. Esses compostos não apenas contribuem para o aroma e sabor característicos das cervejas, mas também demonstram potencial para serem utilizados com finalidades medicinais (Lin *et al.*, 2019). Nesse contexto, a pesquisa em bioquímica vegetal emerge como uma fonte promissora para a identificação de moléculas com aplicabilidade nas indústrias farmacêuticas (European Medicine Agency, 2014; Zanolli, Zavatti, 2008; Silva *et al.*, 2022).

As substâncias bioativas encontradas no lúpulo atraem crescente atenção no meio científico devido às suas atividades significativas, especialmente no contexto de patologias relacionadas a doenças degenerativas e crônicas, nas quais os processos oxidativos desempenham um papel central. Uma substância com ação antioxidante possui a capacidade de atenuar ou mesmo prevenir a oxidação de substratos, o que, por sua vez, reduz o estresse oxidativo. Além disso, foram observados efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores associados ao consumo de compostos derivados do lúpulo (Zugravu *et al.*, 2022).

A composição fitoquímica principal do lúpulo inclui as humulonas (α -ácidos), que conferem amargor às cervejas, e os óleos essenciais, responsáveis por proporcionar aroma às cervejas. Além da utilização no âmbito cervejeiro, esses compostos, juntamente com outros presentes no lúpulo, têm potencial para desenvolver produtos terapêuticos em pesquisas farmacêuticas, destacando a versatilidade e o valor dessa planta na indústria e na área da saúde (Fischer, 2021).

Os α -ácidos, encontrados no lúpulo, tem evidenciado propriedades benéficas para a saúde. Estudos de caracterização fitoquímica demonstraram que tais ácidos amargos são responsáveis por ação bioativa multipotente, ou seja, possuem ampla aplicação para fins terapêuticos. Alguns exemplos são a sua eficiência comprovada *in vitro* contra neoplasias através de função pró-apoptótica, antiangiogênica, antiproliferativa, desintoxicante, anti-inflamatória e antioxidante, além de ter utilidade no combate a osteoporose, síndrome metabólica, infecções bacterianas e efeitos antidepressivo e sedativo no sistema nervoso central (Van-Cleemput *et al.*, 2009).

No entanto, os efeitos terapêuticos específicos dos α -ácidos presentes no lúpulo, ainda são pouco caracterizados, o que torna relevante o estudo da capacidade antioxidante dessa substância. Essas pesquisas podem desempenhar um papel importante na identificação de uma nova estratégia terapêutica segura e eficaz, especialmente como um inibidor de radicais livres gerados devido à exposição à luz solar, consumo de substâncias prejudiciais e dietas inadequadas, entre outros fatores ambientais e de estilo de vida.

Diante disso, o estudo visa avaliar a capacidade antioxidante *in vitro* de extratos obtidos de três variedades de lúpulo ricos em α -ácidos (El dorado -15,7%; Ekuanot-14,6%; Hércules-14,4%). Para isto, foram utilizados três métodos de extração: agitação magnética, ultrassom e à frio. A avaliação da capacidade antioxidante *in vitro* dos extratos envolveu a aplicação de diversos métodos, como o método de sequestro de radicais livres DPPH, o método do radical catiônico ABTS, o método do Complexo Fosfomolibdênio, o método do Poder Redutor e a determinação do teor dos Compostos Fenólicos Totais. Essas análises permitem determinar o potencial antioxidante dos extratos, revelando sua capacidade de combater o estresse oxidativo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Aquisição das amostras para a realização das análises

Os lúpulos, na forma de *pellets*, das variedades El dorado, Ekuanot e Hércules foram adquiridos em estabelecimento comercial de produtos para a fabricação cervejeira. A quantidade de alfa ácidos de cada variedade foi obtida a partir dos laudos oriundos do fornecedor. Os *pellets* foram armazenados a -4°C, com o intuito de manter as propriedades substanciais da amostra e evitar perdas significativas nos fitoquímicos de relevância.

2.2 Preparação dos extratos

A escolha dos métodos extrativos foi baseada na eficácia em extrair os compostos desejados do material vegetal em estudo, além de considerações práticas, como custo, disponibilidade de equipamentos e facilidade de execução.

2.2.1 Extração por agitação magnética (AM), ondas ultrassônicas (US) e à frio (AF)

10 g dos três tipos de lúpulos peletizados (El dorado, Ekuanot e Hércules) foram submetidos a trituração manual até obter uma mistura homogênea, adicionado de 100 mL de água filtrada por osmose reversa, e concomitantemente, estas amostras foram colocadas em agitador magnético, em ondas ultrassônicas e em repouso durante 60 minutos, em temperatura ambiente, a cada 15 minutos homogeneizados manualmente. Em seguida, as soluções foram filtradas e uma alíquota de 90 mL dos três extratos aquosos foram acondicionados em potes

plásticos estéreis, para posterior diluições, e armazenados no ultrafreezer a -80 °C até o início das análises. O procedimento de extração foi conduzido em triplicata.

2.3 Análise da atividade antioxidante e dos compostos fenólicos totais

2.3.1 Método 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 *et al.* (2008) e Guimarães *et al.* (2011), seguidas de pequenas modificações. Uma solução etanólica de DPPH foi preparada na concentração de 40 µg mL⁻¹. Para a avaliação, 2,7 mL da solução de DPPH foram adicionadas em tubos de ensaio, seguidos da adição de 0,3 mL de cada diluição dos extratos de lúpulo 10000; 8000; 6000; 4000 e 2000 µg mL⁻¹. Em paralelo, preparou-se o controle negativo, contendo todos os reagentes, exceto o extrato. Após 60 minutos, em ausência de luz, as leituras foram realizadas utilizando o espectrofotômetro no comprimento de onda de 517 nm. Todos os testes foram realizados em triplicata. A atividade antioxidante (AA%) foi calculada usando a seguinte equação:

$$AA\% = [(A_{CN} - A_{Amo}) / A_{CN}] * 100$$

Em que:

A_{Amo} = Absorbância do DPPH com a amostra.

A_{CN} = Absorbância do DPPH com o etanol.

2.3.2 Método ABTS

A formação do cátion radical ABTS ((2,2-azinobis-[3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico]) foi realizada de acordo com Antunes *et al.* (2010). Para o ensaio foram misturados 10 µL dos extratos de lúpulo (10000; 8000; 6000; 4000 e 2000 µg mL⁻¹) e 990 µL da solução do radical ABTS•+. A absorbância das amostras foi monitorizada espectrofotometricamente a 735 nm, após permanecerem 6 min em ausência de luz. O controle negativo foi realizado a partir da leitura da absorção de uma amostra contendo a mesma quantidade de etanol e uma solução do radical ABTS•+. Todos os testes foram realizados em triplicata. A porcentagem de inibição do radical ABTS•+ (AA%) pelas amostras foi calculada de acordo com a seguinte equação.

$$AA\% = [(A_{CN} - A_{Am}) / A_{CN}] * 100$$

Em que:

A_{CN} = Absorbância do controle negativo

A_{Am} = Absorbância da amostra

2.3.3 Determinação do teor dos compostos 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 dos extratos de lúpulo com 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$). 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 2 h de incubação à temperatura ambiente, em ausência de luz. O ácido gálico ($15,625; 31,25; 62,5; 125; 250; 500 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) 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.

2.3.4 Método de redução do Complexo de Fosfomolibdênio

O método do fosfomolibdênio foi realizado conforme Prieto *et al.* (1999). Uma alíquota de 0,1 mL do extrato de lúpulo 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 $62,5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$). Os resultados também foram expressos em miligramas de equivalente de BHT por grama de extrato (mg EBHTg^{-1}).

2.3.5 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). 100 μL do extrato de lúpulo foram misturadas

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 a mistura agitada em vórtex. Em seguida, 3 mL de água destilada e 600 µL cloreto férrico 0,1%. Foram adicionadas ao meio reacional. 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 µg mL⁻¹). Os resultados também foram expressos em miligramas de equivalente de BHT por grama de extrato (mg EBHTg⁻¹).

2.4 Análises estatísticas

Para a avaliação dos dados dos testes antioxidantes DPPH e ABTS os experimentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial (9 x 5), sendo (9 extratos do lúpulo) em 5 concentrações (10000; 8000; 6000; 4000 e 2000 µg mL⁻¹), com 3 repetições. Já para os testes Complexo Fosfomolibdênio, Poder Redutor e Teor de Compostos Fenólicos Totais, os experimentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado (DIC) para 9 tipos de extratos (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). Já para o teste do teor de fenólicos totais os resultados foram plotados em gráficos de barras com os valores de 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.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

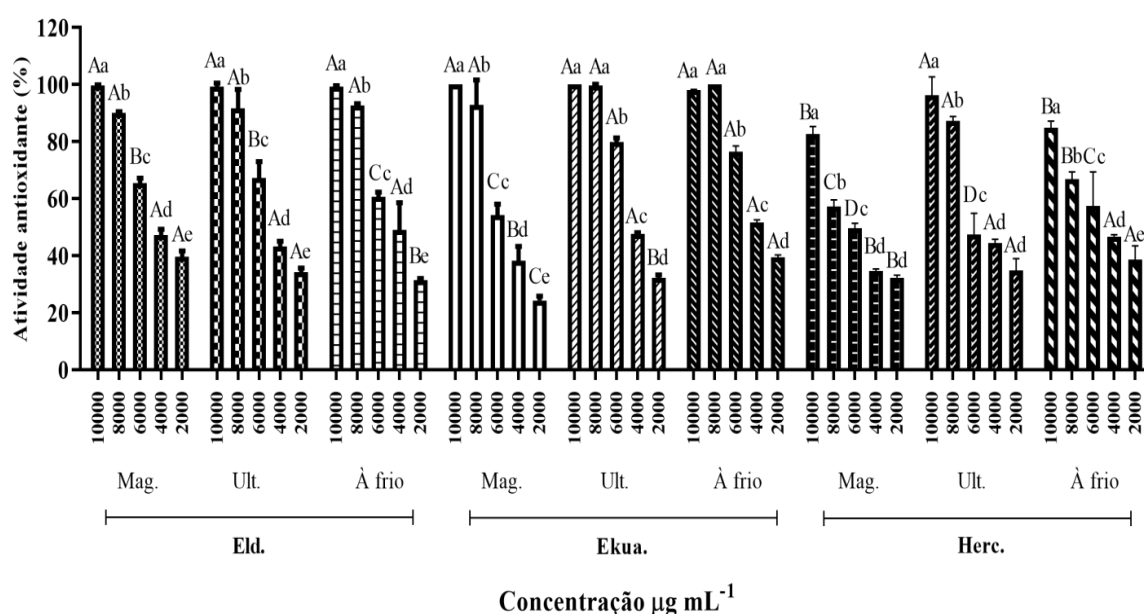
Os métodos DPPH e ABTS foram empregados para determinar a capacidade de sequestro de radicais livres dos extratos, enquanto a análise de compostos fenólicos quantificou os componentes responsáveis pela atividade antioxidante. Além disso, o ensaio do composto fosfomolibdênio foi utilizado para avaliar a capacidade antioxidante total dos extratos, assim como a metodologia do poder redutor. Considerando os extratos das três

variedades de lúpulo (El dorado, Ekuanot e Hércules) como fonte de antioxidantes, os resultados estão expressos a seguir.

Os resultados de atividade antioxidante obtidos por meio do método DPPH avaliou a capacidade antioxidante por meio da neutralização do radical que leva o nome do método (Figura 1).

Figura 1 - Atividade antioxidante pelo método DPPH utilizando 3 variedades de lúpulo (El dorado, Ekuanot e Hércules) e 3 tipos de extração (agitação magnética, ultrassom e à frio). Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas para comparar a concentração entre os extratos e minúsculas para comparar a concentração dentro de cada extrato, não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

Legenda: Mag.- Agitação Magnética; Ult. – Ultrassom; À frio – À frio; Eld. – Eldorado; Ekua. – Ekuanot; Herc. – Hércules.



Fonte: Elaboração própria.

Comparando os extratos em todos os métodos de extração percebe-se que se tratou de resultados dose-dependentes, isto é, a medida que aumenta a concentração ocorreu um aumento na atividade antioxidante. A dose-dependência foi identificada em todos os extratos, mas no extrato Ekuanot esta atividade ocorreu na concentração 8000 a 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ nos métodos de extração por Ultrassom e À Frio. Já para o extrato Hércules foi observado essa atividade dose-dependência no método por Agitação Magnética e Ultrassom entre as concentrações de 10000 até 4000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Dentre os ensaios realizados, nota-se que a maior concentração trabalhada, 10000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, apresentou resultados estatisticamente similares em todas as variedades e métodos extrativos, exceto no extrato Hércules na extração por Agitação Magnética e À frio, que apresentou resultados significativamente menores. O mesmo comportamento também foi

observado nos extratos com concentração de $8000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Já na concentração $6000 \mu\text{g mL}^{-1}$, os maiores resultados obtidos ocorreram com o Ekuanot por Ultrassom e À frio e o menor com o Hércules por Agitação Magnética e Ultrassom. Para a concentração $4000 \mu\text{g mL}^{-1}$, estatisticamente, o maior resultado foi expresso pelo o extrato El dorado para as três extrações, Ekuanot e Hércules pelas extrações por Ultrassom e À frio, e menor, os extratos Ekuanot e Hércules na extração por Agitação Magnética. E para a $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$, o extrato de El dorado por Agitação Magnética e Ultrassom; Ekuanot pela extração À frio; e Hércules pela extração por Ultrassom e À frio, apresentaram resultados maiores, estatisticamente semelhantes, enquanto o extrato Ekuanot por Agitação Magnética expressou menor resultado e diferença estatística.

Arruda *et al* (2020) analisou a composição química e o potencial antioxidante de extratos hidroetanólicos de lúpulos cultivados no Brasil das variedades Spalt, Saaz, Vitória, Cascade, Mantiqueira, Columbus, Brasylijsk, “Canastra” e Halertau Miltfruh. De acordo com os resultados obtidos, a atividade antioxidante dos extratos em estudo assumiu valores entre $24,11$ e $43,66 \mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$, tendo a cultivar Halertau Mittelfrüh apresentado um potencial antioxidante superior ao verificado para a variedade tcheca comercial utilizada como parâmetro de comparação (Premiant – $25,48 \mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$). Relacionando ao atual trabalho, nota-se que as análises foram realizadas a partir de extratos aquosos, mas por métodos extrativos distintos, sem a presença do etanol citado por Arruda *et al.* (2020), ainda assim foi capaz de apresentarem atividade antioxidante.

Santana (2020) analisou a constituição química e os potenciais antioxidante e antimicrobiano do óleo essencial e da resina *H. lupulus* var. Columbus cultivado no Brasil, bem como, comparou os resultados obtidos com os dados disponíveis na literatura para o lúpulo da mesma espécie comercializado na forma de peletes (EUA). Os ensaios biológicos (*in vitro*) destes extratos detectaram atividade antioxidante ($>85 \text{ AA}\%$) pelo método DPPH. Resultado similar foi encontrado no presente estudo nas concentrações 10000 e $8000 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Silva *et al.* (2022) avaliaram a atividade antioxidante de extratos aquosos de diferentes variedades de lúpulo, tanto de aroma (Eastr Kent Golding, Sladek e Cascade) quanto de amargor (Galena, Sorochi Ace e Columbus Zeus), usando o método DPPH. Os resultados revelaram uma ampla variação na atividade antioxidante, sendo que a variedade Sorochi a $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ apresentou a maior atividade antioxidante ($86,17\%$), enquanto o Columbus mostrou a menor atividade ($6,81\%$) a $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$. O aumento da concentração levou a uma maior atividade antioxidante, tanto no padrão utilizado, o BHT (Butilhidroxitolueno), quanto nas variedades de lúpulo. Comparando estes resultados aos do presente trabalho, corroboram com a ideia que o

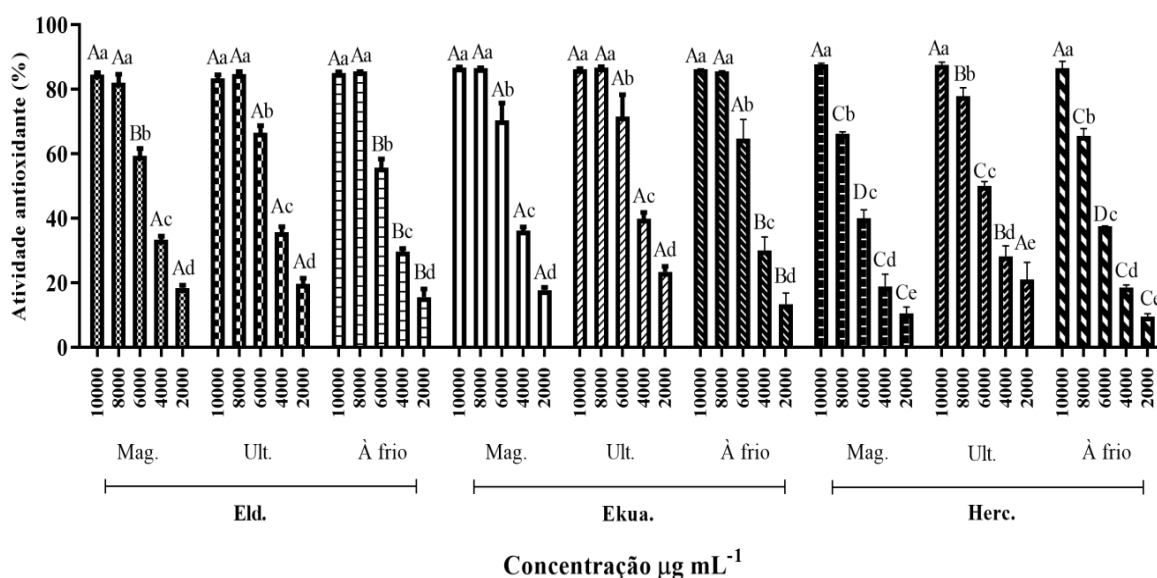
potencial antioxidante não está associado a variedade, pois todos apresentaram um padrão de que quanto maior a concentração maior a atividade antioxidante. Nesse contexto, observa-se que, estatisticamente, os maiores resultados foram vistos nas variedades El dorado e Ekuanot, e nos métodos de extração por Ultrassom e À frio, enquanto os menores resultados de atividade antioxidante foram principalmente observados na variedade Hércules pela extração por Agitação Magnética.

Lyu *et al.* (2022) avaliaram as propriedades antioxidantes utilizando os ensaios DPPH em extratos de estróbilos de lúpulo (Calypso, Cascade, Cluster, El dorado, Magnum, Saaz) em dois solventes diferentes (etanol e água). Na análise, o cultivar El Dorado revelou maior atividade antioxidante nos extratos etanólicos (IC_{50} 124,3 $\mu\text{g/mL}$) quando comparado com os demais cultivares. Este resultado valida e corrobora com obtidos no presente trabalho, no qual a variedade El dorado também foi uma das que apresentou maior atividade antioxidante.

O método ABTS, que utiliza o radical ABTS, 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. Os resultados obtidos de atividade antioxidante medidos pelo método ABTS estão expressos na Figura 2.

Figura 2 - Atividade antioxidante utilizando 3 variedades de lúpulo analisadas (El dorado, Ekuanot e Hércules) e 3 tipos de extração (agitação magnética, ultrassom e à frio) pelo método ABTS. Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas para comparar a concentração entre os extratos e minúsculas para comparar a concentração dentro de cada extrato, não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

Legenda: Mag.- Agitação Magnética; Ult. – Ultrassom; À frio – À frio; Eld. – Eldorado; Ekua. – Ekuanot; Herc. – Hércules.



Fonte: Elaboração própria.

Analisando os resultados, todas as extrações na concentração $10000 \mu\text{g mL}^{-1}$ obtiveram resultados iguais estatisticamente em todos os extratos. Já na concentração de $8000 \mu\text{g mL}^{-1}$, as maiores atividades antioxidantes foram encontradas nos extratos El dorado e Ekuanot em todos os métodos de extrações. Já os menores resultados estatisticamente nessa concentração foram para a variedade Hércules na extração por Agitação Magnética e À frio. Para a concentração $6000 \mu\text{g mL}^{-1}$, os maiores resultados ocorreram na variedade El dorado pelo Ultrassom e Ekuanot em todas as extrações, enquanto o menor resultados foi apresentado pelo Hércules na Agitação Magnética e Ultrassom. Já nas concentrações 4000 e $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$, os maiores resultados ocorreram na variedade Eldorado e Ekuanot pela extração por Agitação Magnética e Ultrassom, e os menores resultados foram apontados pelo extrato Hércules por meio da extração por Agitação Magnética e À frio.

Comparando os resultados obtidos entre DPPH e ABTS, as variedades Eldorado e Ekuanot apresentaram maior capacidade antioxidante, enquanto os menores resultados foram obtidos para o extrato da variedade Hércules pela metodologia por Agitação Magnética e À Frio.

Relacionando os extratos em todos os métodos de extração, observou-se que houve uma atividade antioxidante dose-dependente, ou seja, a medida em que aumenta a concentração ocorreu um aumento na atividade antioxidante. Para os extratos da variedade Ekuanot e Eldorado essa dose dependência ocorreu a partir da concentração $8000 \mu\text{g mL}^{-1}$ até a concentração $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Já para os extratos de variedade Hércules ela ocorreu da maior concentração $10000 \mu\text{g mL}^{-1}$, até a menor $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Kowalczyk *et al.* (2013) investigaram por meio de três métodos de extração (água, 50% metanol e 50% etanol) os rendimentos de substâncias fenólicas e a capacidade antioxidante de extratos obtidos a partir de duas variedades de lúpulo em cone (Magnum e Marynka) e seus pellets (T90 e T45). Os resultados indicaram que os extratos hidroalcoólicos de cones de lúpulo e pellets de lúpulo não mostraram diferenças significativas na eliminação do radical ABTS. No entanto, a extração com água revelou que os cones de lúpulo tiveram uma maior capacidade antirradical em comparação com os pellets. Este resultado corrobora com o estudo do trabalho atual, pois os extratos obtidos foram aquosos e a partir de pellets.

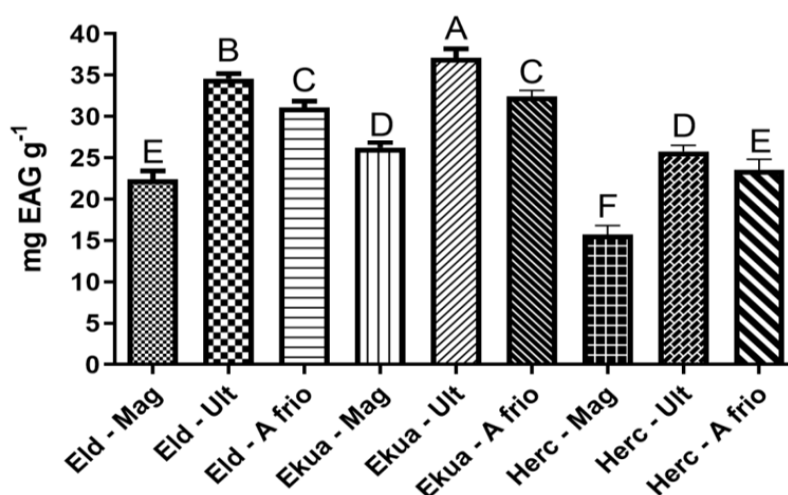
Em um estudo, Nascimento (2023) analisou o potencial antioxidante das flores do lúpulo e as propriedades farmacológicas para tratar gota, diabetes do tipo 2 e doença de Alzheimer, a partir dos extratos produzidos por extração Soxhlet (hexano e metanol). No ensaio antioxidante ABTS, demonstrou capacidade elevada do xanthohumol em inibir esse radical cátion. Este resultado apresenta uma semelhança com o trabalho realizado, mesmo que o produto usado para

obter os extratos não foram os pellets, isto, reforça que independente do material utilizado, há sim uma atividade antioxidante vista pelo método ABTS.

Outro teste realizado para avaliar a atividade antioxidante e quantificar os compostos fenólicos totais é a metodologia que utiliza o reagente Folin Cicateau. A avaliação destes compostos fenólicos totais nas distintas amostras demonstra o potencial da capacidade antioxidante dos extratos. Os resultados obtidos do estudo de compostos fenólicos totais estão dispostos na Figura 3.

Figura 3 – Teor de compostos fenólicos totais utilizando 3 variedades de lúpulo analisadas (El dorado, Ekuanot e Hércules) e 3 tipos de extração (agitação magnética, ultrassom e à frio). Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

Legenda: Mag.- Agitação Magnética; Ult. – Ultrassom; À frio – À frio; Eld. – Eldorado; Ekua. – Ekuanot; Herc. – Hércules.



Fonte: Elaboração própria.

Os extratos das variedades Ekuanot (37,06 mg EAGg⁻¹) e El dorado (34,56 mg EAGg⁻¹), ambos obtidos por ultrassom, apresentaram maior concentração de compostos fenólicos totais. Já o menor resultado, foi encontrado no extrato Hércules extraído por Agitação Magnética (15,73 mg EAGg⁻¹).

Por se tratar de um método que determina a concentração total de compostos fenólicos, e estes são conhecidos por seu potencial antioxidante, foi possível indicar que os extratos de Ekuanot e Eldorado foram os que apresentaram maior concentração desses compostos pelo método Ultrassom. Já o extrato da variedade Hércules, foi o extrato que apresentou a menor concentração de compostos fenólicos totais.

Estes resultados, apesar de obtidos a partir de uma metodologia diferente das outras realizadas até então, ABTS e DPPH, demonstraram que os extratos de Ekuanot e El dorado pelo método de Ultrassom foram os que apresentaram maior concentração de compostos fenólicos, reforçando mais uma vez que a alta concentração dos compostos fenólicos está relacionada a

alta capacidade antioxidante destas amostras, como já evidenciado pelos ensaios ABTS e DPPH.

Kowalczyk *et al.* (2013) observaram que os extratos aquosos das variedades de lúpulo Marynka apresentaram uma maior capacidade de eliminação de radicais livres em comparação com os extratos da variedade Magnum. Isso pode ser explicado pela maior quantidade de compostos fenólicos totais nos extratos de lúpulo Marynka, que são conhecidos por suas propriedades antioxidantes. Este resultado é similar aos encontrados no presente trabalho, pois algumas variedades se mostraram superiores ao analisar os compostos fenólicos, como a variedade Ekuanot e El dorado obtidas pelo método Ultrassom, que otimizou a extração.

Almeida *et al.* (2019) caracterizaram os compostos bioativos do lúpulo cultivado em grande escala no Brasil, comparando-o com a mesma variedade proveniente dos Estados Unidos e aplicou os extratos resultantes em filmes poliméricos ativos. Os resultados revelaram que a amostra de lúpulo brasileiro exibiu uma atividade antioxidante superior em comparação com a amostra dos Estados Unidos. Essa diferença pode ser atribuída ao maior teor de compostos conhecidos por sua atividade antioxidante. O formato utilizado para tal estudo foi na forma de *pellets*. A forma utilizada do lúpulo no presente trabalho também foi em formato de pellets, isto garante a máxima integridade dos compostos presentes no lúpulo, consequentemente, sua atividade antioxidante.

Santana (2020) comparou os perfis químicos de lúpulo da variedade Columbus, cultivado no Brasil e nos EUA, e viu que a relação do amargor está interligada com concentração de compostos fenólicos, ou seja, quanto maior a concentração de compostos fenólicos nota-se o aumento do nível de amargor do lúpulo. Isto pode ser visto no trabalho em questão, pois as variedades de lúpulo que mostraram maiores valores nos resultados de compostos fenólicos (Ekuanot e El dorado) são os lúpulos que foram adquiridos comercialmente com teor mais alto de amargor.

Silva (2020) quantificou os compostos fenólicos em folhas de *H. lupulus* e encontrou valores de 75,50 mg EAGg⁻¹ para o extrato etanólico bruto e 91,85 mg EAGg⁻¹ para o extrato hidrometanólico. As menores concentrações de fenólicos obtidas no presente trabalho podem ter sofrido influência do solvente usado, já que Silva (2020) utilizou etanol e metanol, possibilitando extrair maiores quantidades de compostos fenólicos.

Estudo desenvolvido por Arruda *et al.* (2021) analisou extratos hidroetanólicos nas variedades Canastra e Columbus e esses expressaram maiores teores de compostos fenólicos, 35,10 e 31,09 mg EAGg⁻¹, respectivamente. Já as variedades Spalt e Saaz apresentaram menores teores, 15,22 e 14,31 mg EAGg⁻¹. Resultados similares foram reportados no presente

trabalho, entretanto no estudo de Arruda *et al.* (2021) foram utilizados lúpulos de aroma, que tem uma menor concentração de alfa ácidos, quando comparados com o lúpulo de amargor. Além disso, a extração foi feita com etanol, que possibilitou uma melhor extração dos compostos fenólicos.

Já Albara (2022) quantificou os compostos fenólicos em extrato etanólico das folhas de *H. lupulus* da variedade Columbus, pelo método de Folin-Ciocalteu. O resultado identificado foi de 29,25 mg EAG g⁻¹. Este resultado apresentou-se semelhante aos encontrados na pesquisa, pois as variedades trabalhadas são lúpulos de amargor.

Os resultados obtidos comparados com os resultados dos autores já citados anteriormente reforçam a hipótese de que os extratos vegetais com níveis mais elevados de compostos fenólicos demonstram um maior potencial antioxidante (Justo *et al.*, 2008). Essa associação entre a concentração de fenólicos e a atividade antioxidante robustece a importância desses compostos no desenvolvimento de produtos com propriedades bioativas??.

Na tabela 1 está exposto os resultados da atividade antioxidante, em mg EBHT g⁻¹, determinados pelo método do Complexo Fosfomolibdênio e do Poder Redutor em relação ao padrão antioxidante BHT (Butilhidroxitolueno).

Tabela 1. Valores das atividades antioxidantes equivalentes ao padrão antioxidante BHT (mg equivalente ao BHT por g do extrato de lúpulo) das 3 variedades (El dorado, Ekuanot e Hércules) de lúpulo analisadas e 3 tipos de extração (agitação magnética, ultrassom e à frio).

Legenda: Mag.- Agitação Magnética; Ult. – Ultrassom; À frio – À frio; Eld. – Eldorado; Ekua. – Ekuanot; Herc. – Hércules.

	Complexo fosfomolib. mg EBHT g ⁻¹	Poder Redutor mg EBHT g ⁻¹
Eld-Mag	48,5 C	18,9 D
Eld-Ult	55,6 A	35,6 A
Eld-À frio	52,6 B	32,6 B
Ekua-Mag	48,5 C	26,6 C
Ekua-Ult	57,3 A	37,1 A
Ekua-À frio	51,2 B	31,7 B
Herc-Mag	41,8 D	16,5 E
Herc-Ult	51,6 B	26,2 C
Herc-À frio	50,3 B	24,8 C

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

Fonte: Elaboração própria.

Ao analisar os resultados obtidos do complexo fosfomolibdênio e do poder redutor, é possível estabelecer uma similaridade entre os resultados. Destaca-se que o maior resultado obtido para ambos os testes, da redução do complexo fosfomolibdênio e poder redutor foram pelo extrato Ekuanot (57,3 e 37,1 mg EBHT g⁻¹ respectivamente), proveniente da extração por

Ultrassom seguido pelo Eldorado (52,6 e 32,6 1 mg EBHT g⁻¹ de modo respectivo), também pelo método Ultrassom. Já o menor resultado obtido da redução do complexo fosfomolibdênio e do poder redutor foi o da variedade Hércules (41,8 e 16,5 1 mg EBHT g⁻¹) pela metodologia de Agitação Magnética.

Os resultados dos testes DPPH, ABTS e compostos fenólicos encontram-se em harmonia com as tendências observadas nos ensaios da redução do complexo fosfomolibdênio e do poder redutor. Essas similaridades se aplicam tanto às variedades de lúpulo investigadas quanto aos métodos de extração, pois, evidencia que os extratos das variedades Ekuanot e El dorado, e o método de extração por Ultrassom, apresentaram maior atividade antioxidante ($p < 0,05$) e, o extrato de Hércules pelo método por Agitação Magnética expressou os menores resultados.

Niknejad *et al.* (2015) apontou a capacidade do extrato de lúpulo em doar elétrons para a redução do complexo Fe³⁺ (ferricianeto) para Fe²⁺ (ferrocianeto), assim, estes resultados indicam essa propriedade no extrato aquoso de lúpulos de amargor, o mesmo acontece com o presente trabalho, pois os resultados indicam tal atividade no método do Poder Redutor.

George *et al.* (2015) realizou o ensaio de fosfomolibdênio do extrato de lúpulo e constatou que a sua capacidade antioxidante total foi superior ao do extrato de mirtilo, que apresenta muito mais compostos fenólicos que o lúpulo, em todas as concentrações testadas (1; 0,1; 0,01 e 0,001 mg/mL). Isto ocorre devido às diferentes substâncias químicas que apresentam atividade antioxidante, como as substâncias alifáticas que não contem o anel aromático. Este resultado corrobora com o vigente estudo, pois os extratos apresentaram atividade principalmente nas variedades Ekuanot e El dorado, na hipótese de conter maiores concentrações de compostos antioxidantes.

Kolenc *et al.* (2023) avaliou a atividade antioxidante de extratos de lúpulo com diferentes genótipos, oriundos de distintos países (Eslovênia, Canadá, Bélgica, EUA, Rússia, Japão, Inglaterra). Para comparação, os α -ácidos e β -ácidos foram utilizadas para testar o potencial antioxidante. A atividade antioxidante de extratos hidroacetônicos purificados de lúpulo foi investigada usando o método de Capacidade de Redução Férrica do Plasma (FRAP). Entre as variedades de lúpulo, o extrato hidroacetônico Savinjski golding apresentou o maior valor de FRAP (101,6 $\mu\text{mol TE/g DW}$) e o HAE Styrian Eureka exibiu o menor valor de FRAP (63,5 $\mu\text{mol TE/g DW}$). A fração rica em α -ácidos e β -ácidos do extrato de lúpulo purificado apresentou o maior valor geral de FRAP (121,3 $\mu\text{mol TE/g DW}$). Foi relatado um sinergismo entre os diferentes compostos do lúpulo, que podem ser responsáveis pelos resultados obtidos. A presente pesquisa, exibe uma similaridade com o estudo apresentado, já

que a maior atividade antioxidante apresentada pela metodologia do Poder redutor foi dos extratos da variedade Ekuanot e Eldorado, lúpulos de amargor, que possuem uma porcentagem superior de α -ácidos presentes em sua composição.

A variação na capacidade antioxidante dos extratos, conforme apontada pelas diferentes metodologias, sugere que a composição complexa desses extratos pode conter componentes que podem ou não participar dos mecanismos de reações específicas utilizados nas diversas abordagens de avaliação da atividade antioxidante. Isso ressalta a complexidade e a diversidade dos compostos presentes nos extratos de lúpulo e a necessidade de mais análises, com mais testes antioxidantes, para entender plenamente sua capacidade antioxidante.

4 CONCLUSÃO

Embora os extratos dos lúpulos tenham demonstrado atividade antioxidante em todas as análises realizadas, as variedades Ekuanot e Eldorado se destacaram de maneira positiva. Além disso, ao considerar a metodologia de extração, o método extrativo por ondas ultrassônicas se destacou por proporcionar a maior extração dos compostos com propriedades antioxidantes.

Esses resultados são de grande importância não apenas para a compreensão da capacidade antioxidante das variedades de lúpulo, mas também por indicar os métodos de extração que permitem uma melhor aplicação industrial destes extratos em produtos com propriedades antioxidantes e também trabalhá-los em organismos vivos para ver a atuação destes antioxidantes em processos oxidativos naturais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBARA, S. P. **Quantificação de compostos fenólicos nas folhas de *Humulus lupulus* L. (lúpulo)**. Monografia (Graduação em Farmácia) - Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 20 f., 2022.
- 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.
- 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.
- 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.
- ARRUDA, T. R. **Atividades antioxidante e antimicrobiana dos primeiros cultivares de lúpulo (*Humulus lupulus* L.) produzidos no Brasil**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre – ES. 2020.
- ARRUDA, T. R. *et al.* A new perspective of a well- recognized raw material: Phenolic content, antioxidante and antimicrobial activities and α – and β - acids, profile of Brazilian hop (*Humulus lupulus* L.) extracts. **Lwt.** v. 141, p. 110905, 2021.
- 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.
- BONTEMPO, N. J. S.; ORSOLIN, P. Efeito anticarcinogênico do Gerioox® em *Drosophila melanogaster*. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.14, n. 26; p. 318-327, 2017.
- BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.
- COSTA, W. F. *et al.* Lapachol como agente inibidor de tumor epitelial em heterozigoto de *Drosophila melanogaster* para o gene supressor tumoral *wt*s. **Genet. Mol. Res.** v.10, n. 4, p. 3236-3245, 2011.
- DORNELAS, C. A.; MORAES FILHO, M. O. Carcinogênese experimental de bexiga e o índice de carcinogênese. **E-book**. Fortaleza: Imprensa Universitária, p. 182, 2016. Acesso em: 15 out. 2023. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/19467>.
- DURELLO, R. S.; SILVA, L. M.; BOGUSZ, S. Química do lúpulo. **Química Nova**, v. 42, p. 900-919, 2019.

ELROD, S. M. *et al.* Relationship between Phenolic and Antioxidant Concentration of *Humulus lupulus* and Alpha Acid Content. **Journal Of The American Society Of Brewing Chemists**, v. 77, n. 2, p. 134-139, 3 abr. 2019.

EUROPEAN MEDICINE AGENCY (EMA). **Assessment report on *Humulus lupulus* L., flos.** 2014.

FERREIRA, R. H. *et al.* Inovação na fabricação de cervejas especiais na região de Belo Horizonte. **Perspectivas em Ciência da Informação**, [S.L.], v. 16, n. 4, p. 171-191, 2011.

FISCHER, B. **Obtenção e caracterização de óleo essencial e extrato de lúpulo (*Humulus lupulus*) por hidrodestilação e extração com CO₂ subcrítico.** Tese (Doutorado) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim. 2021.

GEORGE, B. *et al.* Antioxidant activity of *Humulus lupulus* and *Vaccinium myrtillus* individual and combined extracts. **Romanian Biotechnological Letters**, Bucureste, v. 20, n. 2, p. 10277-10285, 2015.

GUAN, G.; LAN, S. Implications of Antioxidant Systems in Inflammatory Bowel Disease. **BioMed Research International**. 2018.

GUIMARÃES, B. P. **Avaliação do lúpulo (*Humulus lupulus* L.) cultivado no Distrito Federal para uso cervejeiro.** Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química Programa de Pós-Graduação em Química. Brasília, 2021.

GUIMARÃES, L. G. L. *et al.* Atividades antioxidante e fungitóxica do óleo essencial de capim-limão e do citral. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 42, p. 464-472, 2011.

HUSSAIN, A. I. *et al.* Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. **Food Chem.** v. 108, n. 3, p. 986–995, 2008.

JASKULA-GOIRIS, B. *et al.* The Use of Hop Polyphenols during Brewing to Improve Flavor Quality and Stability of Pilsner Beer. **Journal Of The American Society Of Brewing Chemists**, [S.L.], v. 72, n. 3, p. 175-183, 2014.

KARABIN, Marcel *et al.* Biotransformations and biological activities of hop flavonoids. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 6, p. 1063-1090, 2015.

KOLENC, Z. *et al.* Antioxidant Activity of Different Hop (*Humulus lupulus* L.) Genotypes. **Plants (Basel)**. v. 12, n. 19, p. 3436, 2023.

KOWALCZYK, D. *et al.* The phenolic content and antioxidant activity of the aqueous and hydroalcoholic extracts of hops and their pellets. **Journal Of The Institute Of Brewing**, [S.L.], p. 103-110, jul. 2013.

KROFTA, K. *et al.* Antioxidant Characteristics of Hops and Hop Products. **Journal Of The Institute Of Brewing**, [S.L.], v. 114, n. 2, p. 160-166, 2008.

KUMAR S.; PANDEY, A. K. Free Radicals: Health Implications and their Mitigation by Herbals. **Journal of Advances in Medicine and Medical Research**, v. 7, n. 6, p. 438-457, 2015.

LELA, L. *et al.* Nanotechnological exploitation of the antioxidant potential of *Humulus lupulus* L. extract. **Food Chemistry**, p. 133401, 2022.

LIBÓRIO, F. H. D. M.; FELIPE, D. F.; BIDO, G. D. S. **Plantas medicinais e seu potencial anticarcinogênico**. In: Anais Eletrônico do XI EPCC - Encontro Internacional de Produção Científica. Anais. Maringá (PR) UNICESUMAR, 2019. Acesso em: 21/09/2023. Disponível em: <https://www.even3.com.br/anais/epcc2019/188084-PLANTAS-MEDICINAIS-E-SEU-POTENCIAL-ANTICARCINOGENICO>.

LIMA, P. M. A. P. *et al.* Efeitos de um refrigerante carbonatado na incidência de tumor epitelial em *Drosophila melanogaster*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 6, p. 240-247, 2018.

LIN, M. *et al.* Role of Characteristic Components of *Humulus lupulus* in Promoting Human Health. **J. Agric. Food Chem.** v. 67 n. 30, p. 8291-8302, 2019.

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.

LYU, J. I. Comparative Study on Phenolic Compounds and Antioxidant Activities of Hop (*Humulus lupulus* L.) Strobile Extracts. **Plants (Basel)**. v.11; n. 1; p. 135, 2022.

MEDEIROS, L. F. C. **Formulação de protetor solar natural a partir da incorporação do extrato da folha de *Humulus lupulus***. Monografia (Graduação em Farmácia) - Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2023.

sMOURATIDIS, P. X. E. *et al.* An investigation into the anticancer effects and mechanism of action of hop β -acid lupulone and its natural and synthetic derivatives in prostate cancer cells. **Nutr. Cancer**, v. 65, n. 7, 1086–1092, 2013.

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**. Tese (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará. Fortaleza. 77 f. 2023.

NETZEL, M. *et al.* Cancer cell antiproliferation activity and metabolism of black carrot anthocyanins. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.8, p.365-372, 2007.

NIKNEJAD, F. *et al.* Antifungal and Antioxidant Effects of Hops (*Humulus lupulus* L.) Flower Extracts. **Advances In Environmental Biology**, [s. l.], v. 24, n. 8, p. 395-401, 2015.

NIKOLIC, D.; VAN BREEMEN, R. B. Analytical methods for quantitation of prenylated flavonoids from hops. **Current analytical chemistry**, v. 9, n. 1, p. 71-85, 2013.

NOBREGA, J. C. S. *et al.* Medicinal plants in the treatment of anxiety and depression: A review. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. e5511124024, 2022.

OJHA, K. *et al.* A review on different methods of determination of antioxidant activity assay of herbal plants. **Research Journal of Life Sciences, Bioinformatics, Pharmaceutic And Chemical Sciences**, Bilaspur, v. 6, n. 4, p. 707-730, 2018.

OLIVEIRA, V. B. *et al.* Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por clae-dad de *Dicksonia sellowiana* (presl.). Hook, dicksoniaceae. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 18, p. 230-239, 2016.

OYAIZU, M. Studies on Products of Browning Reactions: Antioxidative Activities of Product of Browning Reaction Prepared from Glucosamine. **Japan Journal of Nutrition**, 44, 307-315, 1986.

OYENIHI, A. B.; SMITH, C. Are polyphenol antioxidants at the root of medicinal plant anticancer success? **Journal of Ethnopharmacology**. v. 229, p. 54-72, 2019.

PALANISAMY, R. *et al.* Synergistic Anticancer Activity of Plumbagin and Xanthohumol Combination on Pancreatic Cancer Models. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 25, n. 4, p. 2340, 2024.

PIRES, J. S. *et al.* Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu para extratos de algas. **Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo**, p. 1-5, 2017.

PIZZINO, G. *et al.* Oxidative Stress: harms and benefits for human health. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, [S.L.], v. 2017, p. 1-13, 2017.

PRIETO, P. *et al.* Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, [S.L.], v. 269, n. 2, p. 337-341, 1999.

SAMPAIO, J. S. **Análise do potencial fotoprotetor dos extratos de *Humulus lupulus* e formulação de protetor solar de amplo espectro**. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Ouro Preto, 2022.

SANTANA, V. N. **Avaliação da composição química da atividade biológica de *Humulus lupulus* var. *Columbus***. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Jequié, 96f., 2020.

SANTOS, F. C. **Variabilidade fenotípica de alfa ácido de lúpulo (*Humulus Lupulus* L) cultivados nas regiões do Brasil**. Tese de Doutorado. Universidade do Estado de Santa Catarina. 2020.

SANTOS, T. A. **Avaliação de Diferentes Métodos e Solventes de Extração Sobre a Composição Fenólica e Centesimal, Atividade Antimicrobiana e Citotóxica de Extratos dos Frutos da *Momordica charantia* L.** Monografia (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal de Sergipe, Lagarto, p. 83, 2018 a.

SANTOS, V. A. **Estudo fitoquímico e atividade antioxidante do extrato e frações das folhas *Humulus lupulus* (Cannabaceae)**. Monografia (Graduação em Farmácia) – Universidade Federal de Ouro Preto, p. 14, 2018 b.

SCHAEFFER, G.; PEREIRA, G. G. **Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* das variedades de lúpulo Cascade e Teamaker cultivados no Brasil**. Instituto Federal do Espírito Santo, 2023.

SCIENCE OF BEER. **Lúpulo: um olhar químico sobre a planta e sua aplicação na cerveja**. 29 de janeiro 2020. Disponível em: <Lúpulo: um olhar químico sobre a planta e sua aplicação na cerveja (scienceofbeer.com.br)> Acesso em: 25 fevereiro 2024.

SIDOROV, R. A. *et al.* Induction of tumor clones in *D. melanogaster* wts/+ heterozygotes with chemical carcinogens. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 498, n. 1-2, p. 181-191, 2001.

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.

SILVA, R. **Estudo botânico, fitoquímico e avaliação *in silico* e *in vitro* de atividades biológicas de folhas de *Humulus lupulus* L. (Cannabaceae) cultivadas no Brasil**. Tese (Mestrado) – Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2020.

SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p.144-158, 1965.

SKOMRA, U.; KOZIARA-CIUPA, M. Stability of the hop bitter acids during long-term storage of cones with different maturity degree. **Polish Journal of Agronomy**, v. 40, p. 16-24, 2020.

SLIMESTAD, R. *et al.* Chemical Profiling and Biological Activity of Extracts from Nine Norwegian Medicinal and Aromatic Plants. **Molecules**. V. 27; n. 21; p. 7335, 2022.

SOUSA, C. M. *et al.* Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química nova**, v.30, n.2, p. 351-355, 2007.

SPÓSITO, M. B. *et al.* **A cultura do lúpulo**. Piracicaba: ESALQ - Divisão de Biblioteca, n. 68, 81 p. 2019.

STEVENS, J. F.; PAGE, J. E. Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health! **Phytochemistry**. V. 65, n. 10, p. 1317-1330, 2004.

SUCUPIRA, N. R. *et al.* Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. **Journal of Health Sciences**, v. 14, n. 4, 2012.

TANIGUCHI, Y. *et al.* Analysis of the components of hard resin in hops (*Humulus lupulus* L.) and structural elucidation of their transformation products formed during the brewing process. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 47, p. 11602-11612, 2014.

VALKO, M. *et al.* Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem Biol Interact.** V. 160, n. 1, p. 1-40, 2006.

VAN-CLEEMPOT, M. B. *et al.* Hop (*Humulus lupulus*) – Derived Bitter Acids as Multipotent Bioactive Compounds. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 6, p. 1220-1230, 2009.

VELLOSA, J. C. R. *et al.* Oxidative stress: an introduction to the state of the art. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 1, p. 10152-10168, 2021.

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

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.

**ARTIGO 2 – AVALIAÇÃO MODULADORA DE TRÊS VARIEDADES DE LÚPULO
FRENTE A AÇÃO DA DOXORRUBICINA EM CÉLULAS SOMÁTICAS DE
*Drosophila melanogaster***

**AVALIAÇÃO MODULADORA DE TRÊS VARIEDADES DE LÚPULO FRENTE A
AÇÃO DA DOXORRUBICINA EM CÉLULAS SOMÁTICAS DE *Drosophila*
*melanogaster***

**MODULATORY EVALUATION OF THREE HOP VARIETIES AGAINST THE
ACTION OF DOXORUBICIN ON SOMATIC CELLS OF *Drosophila melanogaster***

Bruna Cássia da Silva Teixeira

Mestranda em Biotecnologia

Instituto de Biotecnologia – Universidade Federal de Uberlândia
Rua Vereador Chico Filgueira, 33 – Sala 319 – Bloco Alfa UNIPAM
Campus Patos de Minas
brunacassia@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

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

RESUMO: O câncer é uma doença que apresenta crescimento desordenado de células anormais no corpo. Os compostos bioativos presentes no lúpulo têm despertado interesse, devido às suas atividades relacionados a doenças degenerativas e crônicas, onde os processos oxidativos desempenham um papel central. Destaca-se a capacidade antioxidante dessas substâncias, que pode atenuar ou prevenir a oxidação de substratos, reduzindo o estresse oxidativo. Além disso, observa-se que o consumo de compostos derivados do lúpulo está associado a efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores. Considerando que os compostos fenólicos podem exibir atividade antioxidante, tratamentos eficazes contra alguns tipos de câncer são conduzidos com base nesses compostos fitoquímicos. Isso ocorre porque os radicais livres, considerados potentes agentes carcinogênicos, podem ser neutralizados por compostos antioxidantes. Assim, o objetivo desse trabalho consistiu em avaliar o efeito dos extratos aquosos de lúpulo (El dorado, Ekuanot e Hércules) por meio do teste de tumores epiteliais em células somáticas de *D. melanogaster* (ETT). Foi realizado três experimentos: isolado, co-tratamento e pós-tratamentoutilizando três extratos por métodos distintos de extração (agitação magnética, a frio e ultrassom), e posteriormente feito o tratamento foi analisado os seguimentos de 100 moscas para cada tratamento. O estudo confirmou que os três extratos de lúpulo, não apresentaram atividade carcinogênica, ou seja, não induziu tumores; exibiu ação moduladora sobre a doxorubicina e ação protetora sob as células somáticas. Assim, os extratos de lúpulo apresentam grande potencial no auxílio ao combate aos processos oxidativos e consequentemente ao câncer.

Palavras-chave: Antioxidante, Carcinogenicidade, Fitoterapia, *Humulus lupulus*.

ABSTRACT: Cancer is a disease that presents disordered growth of abnormal cells in the body. The bioactive compounds present in hops have aroused interest due to their activities related to degenerative and chronic diseases, where oxidative processes play a central role. The antioxidant capacity of these substances stands out, which can attenuate or prevent the oxidation of substrates, reducing oxidative stress. In addition, it is observed that the consumption of compounds derived from hops is associated with anti-inflammatory and immunomodulatory effects. Considering that phenolic compounds can exhibit antioxidant activity, effective treatments against some types of cancer are conducted based on these phytochemical compounds. This is because free radicals, considered potent carcinogens, can be neutralized by antioxidant compounds. Thus, the objective of this study was to evaluate the effect of aqueous hop extracts (El Dorado, Ekuanot and Hércules) by testing epithelial tumors in somatic cells of *D. melanogaster* (ETT). Three experiments were carried out: isolated, co-treatment and post-treatment using three extracts by different extraction methods (magnetic agitation, cold agitation and ultrasound), and after the treatment the segments of 100 flies for each treatment were analyzed. The study confirmed that the three hop extracts did not present carcinogenic activity, that is, they did not induce tumors; they exhibited a modulating action on doxorubicin and a protective action on somatic cells. Thus, hop extracts have great potential in helping to combat oxidative processes and consequently cancer.

Keywords: Antioxidant, Carcinogenicity, Phytotherapy, *Humulus lupulus*.

1 INTRODUÇÃO

A origem da palavra “câncer” deriva do grego “karkínos”, que significa caranguejo. Este termo foi primeiramente empregado por Hipócrates, considerado o pai da medicina (Inca, 2011). O surgimento do câncer é um processo complexo, envolvendo fatores que podem ser genéticos, metabólicos e ambientais, mas, independentemente da origem etiológica, são distinguidos por um meio inflamatório precoce e caracterizados por interações discretas com o sistema imunológico na progressão da doença (Tzanakakis *et al.*, 2019).

O câncer trata-se de um grupo de doenças caracterizadas pelo crescimento desordenado de células anormais no corpo, formando tumores que podem invadir tecidos próximos e se espalhar para outras partes do organismo, processo conhecido como metástase (Inca, 2021).

A carcinogênese, que é a formação do câncer, ainda é imprecisa. Além da carcinogênese química, as vias moleculares endógenas e a interação de produtos químicos ambientais com genes e vias metabólicas desempenham papéis significativos nos mecanismos que impulsionam a carcinogênese (Peters; Gonzalez, 2018).

O uso de plantas com finalidades terapêuticas ocorre a milhares de anos, o primeiro registro foi datado aproximadamente no ano 2.800 a. C. Essa prática ancestral evidencia a longa tradição de empregar plantas na prevenção e tratamento de doenças (Wang *et al.*, 2012). Atualmente, a evidência científica confirma que os compostos químicos encontrados em plantas

medicinais têm a capacidade de proteger as células contra eventos carcinogênicos, atuando de forma a combater a promoção e a progressão de tumores (Guim, 2022).

As plantas contêm compostos bioativos, como vitaminas, compostos fenólicos e pigmentos. Esses metabólitos, tal como os compostos fenólicos, atuam como antioxidantes, pois apresentam a capacidade de retardar ou inibir a oxidação de diversos substratos, oferecendo assim uma importante proteção para o organismo humano (Halliwell; Gutteridge, 2000).

O lúpulo, identificado cientificamente como *Humulus lupulus*, é uma planta de regiões tropicais e possui uma extensa história de uso medicinal na Europa. Sua notável riqueza em diversos compostos fitoquímicos tem despertado atenção global. Esses compostos, responsáveis não apenas pelo aroma e sabor distintivos das cervejas, também exibem potencial para aplicação em contextos medicinais (Silva *et al.*, 2022).

Os compostos bioativos presentes no lúpulo têm despertado interesse, especialmente devido às suas atividades relacionados a doenças degenerativas e crônicas, onde os processos oxidativos desempenham um papel central. Destaca-se a capacidade antioxidante dessas substâncias, que pode atenuar ou prevenir a oxidação de substratos, reduzindo o estresse oxidativo. Além disso, observa-se que o consumo de compostos derivados do lúpulo está associado a efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores (Zugravu *et al.*, 2022).

No final do século XX, houve avanços significativos no desenvolvimento de testes de genotoxicidade e mutagenicidade para avaliar o potencial carcinogênico de diversos agentes. Estas metodologias possibilitam a avaliação da toxicidade de substâncias ao identificar fatores de risco químicos (Sousa *et al.*, 2017).

A utilização de organismos modelo é uma ferramenta valiosa para detectar potenciais carcinógenos e entender os efeitos a longo prazo da exposição a substâncias simples e até mesmo as mais complexas (Rocha, Sousa e Morais, 2018). A *Drosophila melanogaster* tem sido fundamental para estudar as bases moleculares e genéticas do câncer humano, ajudando a identificar os mecanismos de ação de vias relacionadas ao câncer (Sharpe *et al.*, 2023). A mesma apresenta um processo evolutivo muito similar ao que acontece com os seres humanos, assim, a investigação sobre a indução e propagação de tumores nas moscas oferece uma base crucial para a compreensão da origem do câncer em humanos (Lima *et al.*, 2018).

O método utilizado para avaliar o teste de tumores epiteliais (ETT), viabiliza a detecção de clones de tumores epiteliais, e utiliza duas linhagens mutantes de *D. melanogaster*, denominadas *mwh* e *wts*. A linhagem *mwh* é mantida em homozigose recessiva para o marcador *mwh* no cromossomo 3, apresentando um fenótipo de pelos múltiplos nas asas, enquanto a linhagem *wts* possui o marcador *wts* no cromossomo 3, conservado em homozigose na presença

do balanceador cromossômico TM3, Sb, atuando como um gene supressor de tumor quando expresso em fenótipo selvagem (Amaral; Reis; Orsolin, 2021).

Considerando que os compostos fenólicos podem exibir atividade antioxidante, tratamentos eficazes contra alguns tipos de câncer são conduzidos com base nesses compostos fitoquímicos. Isso ocorre porque os radicais livres, considerados potentes agentes carcinogênicos, podem ser neutralizados por compostos antioxidantes (Chaves; Ramos, 2023). Assim, o objetivo desse trabalho consistiu em avaliar como os extratos de lúpulo (El dorado, Ekuanot e Hércules) ricos em alfa ácidos se portam por meio do ETT em células somáticas de *D. melanogaster*, a fim de analisar houve uma atividade com capacidade de neutralizar e/ou diminuir a formação tumoral nas moscas ocasionadas pela doxorubicina.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A realização de testes *in vivo* em organismos como as *D. melanogaster*, também conhecidas como moscas-das-frutas, é uma etapa importante para corroborar juntamente aos resultados obtidos em estudos *in vitro*. Os estudos *in vivo* podem fornecer informações valiosas sobre como os antioxidantes presentes nos extratos de lúpulo afetam os organismos e podem ser mais representativos das condições reais do corpo humano. Portanto, foram realizados testes usando esse organismo modelo.

2.1 *Drosophila melanogaster*

As estirpes de *D. melanogaster* utilizadas foram:

1) *wts*/TM3, Sb1: Esta linhagem apresenta um alelo letal (*wts*) localizado no cromossomo 3, e é mantida em equilíbrio genético pelo balanceador cromossômico TM3, que possui múltiplas inversões. Além disso, essa estirpe exibe a característica fenotípica de cerdas curtas devido a uma mutação dominante conhecida como *stubble* (Sb). A linhagem foi obtida através do Bloomington Drosophila Stock Center da Universidade de Indiana, EUA, sob o registro nº Bloomington/7052.

2) *mwh*/*mwh*: As moscas da linhagem *mwh* possuem uma mutação no cromossomo 3 que resulta em múltiplos pelos nas asas (3-0,3). Essa mutação é caracterizada por três ou mais pelos em cada célula e é mantida em homozigose, uma vez que é uma mutação viável. Esta estirpe foi gentilmente fornecida pelo Dr. Ulrich Graf, do Instituto de Ciência Animal da ETH Zurique, localizado em Schwerzenbach, Suíça.

O modelo *in vivo* utilizado foi cultivado e mantido em frascos contendo meio de cultura padrão a base de banana (1230 mL de água; 16,5 g de ágar; 234 g de banana; 37,5 g de fermento biológico e 1,5 g de nipagin em pó) para *D. melanogaster*, no Laboratório de Citogenética e Mutagênese (LABCIM), do Centro Universitário de Patos de Minas, em Patos de Minas – MG.

A *D. melanogaster* é considerada um exímio modelo experimental, pois é útil em testes de toxicologia genética, como também em estudos de processos de reparo de DNA (Nepomuceno, 2015).

2.2 Agente químico

O cloridrato de doxorrubicina (DXR) é um antibiótico antracíclico, que atua como medicamento antitumoral, principalmente através dos processos de oxidação/redução, resultando na produção de radicais livres altamente reativos e tóxicos, ocasionando mudanças na morfologia celular, interferindo diretamente no material genético, induzindo a apoptose nas células cancerosas (Furtado e Lopes, 2019; Rocha *et al.*, 2022). A ação citotóxica da DXR está atribuída a sua ação na enzima topoisomerase II, que exibe atividade proliferativa em células, para isto, a DXR estabiliza o complexo DNA-topoisomerase II, o que impede o processo de multiplicação celular (Figueiredo *et al.*, 2023).

Este composto vem sendo estudado há muitos anos e por se tratar de um antibiótico antitumoral, pode desencadear efeitos por agir diretamente no DNA e induzir mutações e tumores (Chabner e Calabresi, 1996). Assim, no presente estudo, a DXR foi utilizada como controle positivo, comercialmente conhecido como Rubidox® (Lote 1147130, Fab.: 03/2022; Val.: 03/2024), o qual apresenta atividade recombinogênica e carcinogênica comprovada em *D. melanogaster* (Amaral; Reis; Orsolin, 2021). No experimento foi utilizada uma solução de DXR a 0,4 mM diluída em água filtrada por osmose reversa, tal concentração foi baseada em estudos anteriores que demonstrou promover a indução de tumores epiteliais no organismo modelo (Vasconcelos *et al.*, 2017; Amaral; Reis; Orsolin, 2021).

2.3 Teste de Tumor Epitelial (ETT)

No ensaio *in vivo*, foi considerada as mesmas concentrações dos extratos de lúpulo usadas nos testes *in vitro* (10000, 8000, 6000, 4000 e 2000 µg/mL). O ETT seguiu de acordo com a metodologia proposta por Costa *et al.* (2011), no qual os extratos primeiramente foram submetidos ao teste de toxicidade (TX) que avaliou a sobrevivência de 50 moscas expostas ao composto.

Para avaliar a toxicidade, foram usadas larvas heterozigotas *wts+/+mwh* obtidas através do cruzamento entre fêmeas virgens *wts/TM3, Sb1* com machos *mwh/mwh*. As larvas resultantes deste cruzamento (72 horas) foram submetidas a um tratamento crônico com os extratos e suas distintas concentrações por 48 horas. As cepas foram mantidas sob condições laboratoriais ideais, a uma temperatura de 25 ± 4 °C e umidade relativa de 65%, dentro de uma câmara tipo B.O.D, conforme descrito por Costa *et al.* (2011).

O TX avaliou se em alguma concentração, os extratos em estudo (Ekuanot, El dorado e Hércules) apresentaram concentrações tóxicas e subtóxicas nas *D. melanogaster*. As larvas de terceiro ínstar (72 horas) foram quantificadas e alocadas em tubos individuais, cada um contendo 1,5 g de meio de cultura (purê de batata) com 5,0 mL de diferentes concentrações dos extratos em estudo (10000, 8000, 6000, 4000 e 2000 µg/mL), replicadas em triplicata para o cálculo da média. O número de moscas sobreviventes em cada tratamento foi contabilizado como um indicador da toxicidade do composto, seguindo a mesma metodologia descrita por Orsolin *et al.* (2016) e Brandão *et al.* (2022). Após a análise de sobrevivência foi definida que a concentração ideal a ser trabalhada aos respectivos tratamentos.

Baseando no resultado obtido no TX foi realizado em triplicata o ETT nos formatos:

- 1) isolado: as larvas do terceiro estágio (72 horas) lavadas e submetidas aos extratos (5 mL) isolados por 48 horas;
- 2) co-tratamento: as larvas do terceiro estágio (72 horas) lavadas e submetidas aos extratos isolados (5 mL) e a DXR (0,4 mM) (5 mL) simultaneamente, por 48 horas;
- 3) pré-tratamento: as larvas do segundo estágio (66 horas) lavadas e tratadas com a extrato (5 mL). Após 6 horas, as larvas foram lavadas e submetidas tratamento crônico com a DXR (0,4 mM) (5 mL).

Foram utilizados 2 controles:

- 1) Controle negativo, água obtida por osmose reversa, tratamento crônico (48 horas);
- 2) Controle positivo com DXR à 0,4mM, tratamento crônico (48 horas);

Após o período de metamorfose, realizou-se a coleta das moscas, acondicionadas em frascos, as quais foram preservadas em etanol a 70% para análises. As moscas portadoras do

genótipo *wts+/+mwh* foram separadas e identificadas com base na presença de pêlos fenotipicamente selvagens (longos e finos). As moscas adultas que apresentaram pêlos curtos e grossos (TM3, *Sb1/mwh*) foram excluídas, uma vez que não possuem o gene em estudo (*wts*).

Contabilizaram-se 100 moscas para tratamento de cada teste, tratamentos, co-tratamento, pré-tratamento e controles. Os tumores foram visualizados nos segmentos das moscas e contabilizados em tabelas (Anexo A).

2.4 Análise estatística

As comparações estatísticas das taxas de sobrevivência (TX) de *D. melanogaster* foram conduzidas usando o teste Qui-quadrado (X^2) para razões de amostras independentes. Todos os resultados foram analisados usando o GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA). Para a significância estatística, considerou-se $p < 0,05$. Já o teste ETT, foi avaliado pelo teste U não paramétrico de Mann, Whitney e Wilcoxon, com nível de significância $p < 0,05$, utilizando-se o Prophet 5.0 (Phophet Software).

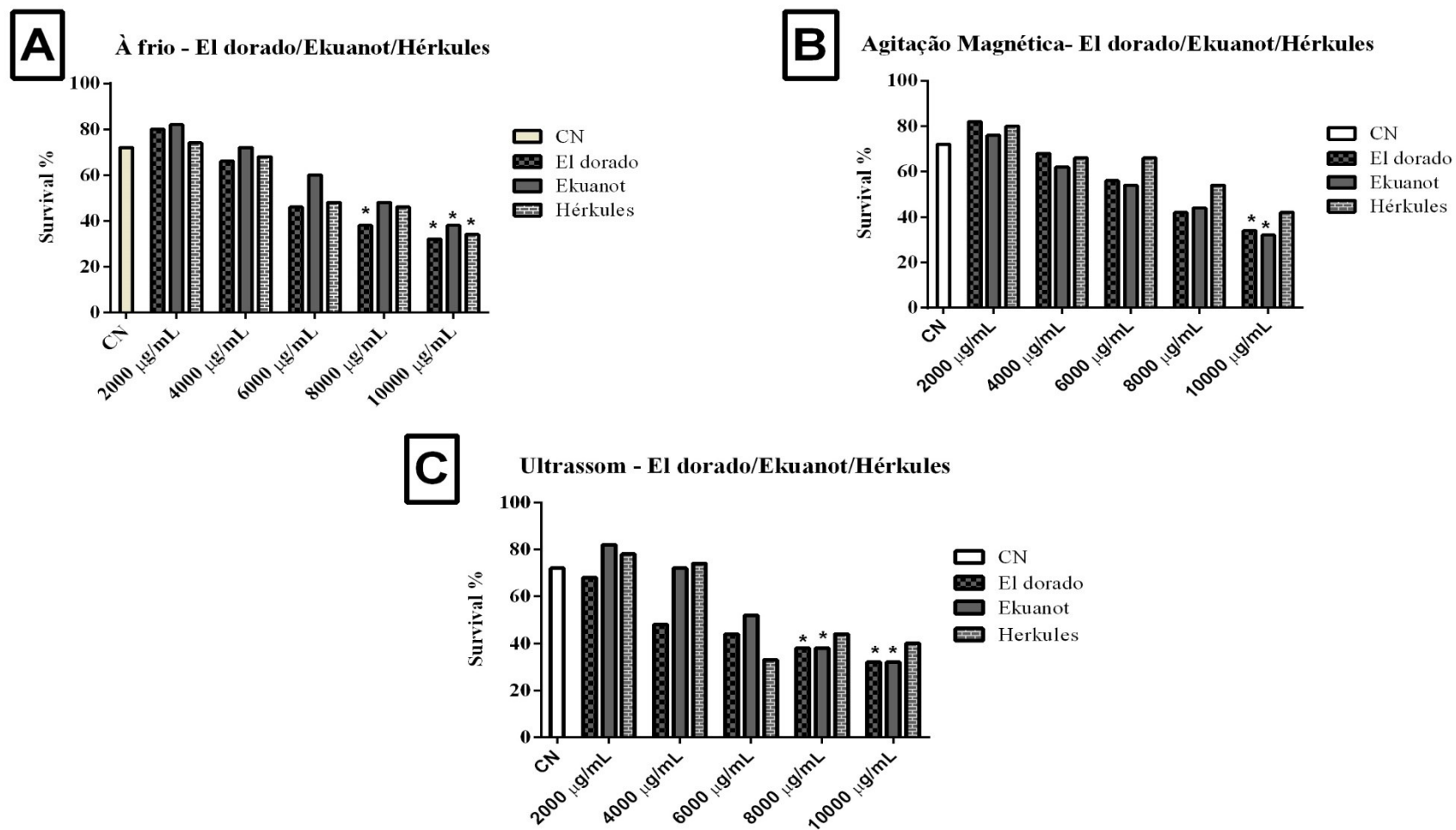
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente trabalho avaliou a toxicidade das cinco concentrações dos extratos de lúpulo utilizando o organismo modelo *D. melanogaster*. A concentração dos extratos a serem trabalhadas no ETT foram definidas a partir do resultado do teste de toxicidade (Figura 1), que avaliou se o composto seria tóxico e/ou letal, e consequentemente a sobrevivência das moscas expostas a estes extratos.

Os dados obtidos direcionaram a definição da concentração de uso dos extratos do lúpulo Ekuanot, El dorado e Hércules em $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ para os três métodos extrativos. A Figura 1 demonstra que evidenciou de todas as concentrações testadas, nenhuma apresentou dose letal ou tóxica, e poderiam ser utilizadas para o teste de ETT, porém, a concentração que mostrou sobrevivência superior a 70%, foi a de menor concentração ($2000 \mu\text{g mL}^{-1}$). Resultado similar foi encontrado no controle negativo (CN), que apresentou mais de 70% de moscas sobreviventes. Diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram notadas nos métodos à frio nas concentrações $8000 \mu\text{g mL}^{-1}$ (El dorado) e $10000 \mu\text{g mL}^{-1}$ (El dorado, Ekuanot e Hércules); no método por Agitação Magnética na concentração $10000 \mu\text{g mL}^{-1}$ (El dorado e Ekuanot); e pelo Ultrassom, na concentração 8000 e $10000 \mu\text{g mL}^{-1}$ (El dorado e Ekuanot).

Tais diferenças observadas são estatisticamente justificáveis e podem ser atribuídas à diminuição da taxa de sobrevivências das moscas.

Figura 1: Taxas de sobrevivência de *Drosophila melanogaster* expostas ao controle negativo (água osmose reversa) e as cinco concentrações dos diferentes tipos de extrato do lúpulo (El dorado; Ekuanot e Hérkules) em relação aos métodos de extração A) À frio, B) Agitação Magnética e C) Ultrassom. * Valor de significância estatística $p < 0,05$.



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Após definida a concentração a ser trabalhada no ETT, os indivíduos passaram pelo tratamento com os três extratos de lúpulo e seus métodos distintos de extração, primeiramente, de forma isolada como explícito na Tabela 1. As frequências de crescimento tumoral para extrato El dorado foram 0,07, 0,06 e 0,04; 0,12, 0,12 e 0,17 para o Ekuanot; e 0,15, 0,19 e 0,16 tumores/mosca para Hércules, enquanto a frequência de tumores no controle negativo foi de 0,18. Com estes resultados pode-se constatar que estes extratos não foram carcinogênicos, ou seja, não tiveram a capacidade de induzir tumores no modelo experimental utilizado, uma vez que não houve diferença significativa em relação ao controle negativo ($p < 0,05$).

Esta relação atribuída aos resultados encontrados foi feita juntamente ao resultado encontrado do controle negativo. As moscas tratadas somente com o controle negativo, sendo esta a água de osmose reversa, apresentaram uma frequência de 0,18 tumores/mosca. Esta leve indução de tumores é algo esperado e se deve à predisposição genética intrínseca deste modelo de organismo (Silva, Vasconcelos e Oliveira, 2022).

É notável a diferença estatística entre os controles negativo e positivo, dada a frequência de tumores contabilizados ETT. O controle positivo se mostrou sensível à indução tumoral, apresentando um aumento significativo ($p < 0,05$) quando relacionado ao controle negativo. Em outras pesquisas, já foi evidenciado que a DXR não é seletiva, mas causa danos em células saudáveis da *D. melanogaster*. A DXR atua intercalando-se no DNA, inibindo a replicação do DNA e a síntese de RNA, o que leva à apoptose das células cancerosas. Este processo é facilitado pela geração de radicais livres que danificam o DNA, proteínas e membranas celulares (Silva; Marques; Araújo, 2021; Moraes *et al.*, 2019; Santos; Orsolin; Lahlou, 2018).

Em um ensaio isolado, analisando o extrato aquoso de romã, foi visto que o mesmo não apresentou efeito carcinogênico, o que significa que ele não induziu a formação de tumores nas moscas tratadas. Este resultado sugere que os compostos bioativos presentes no extrato, como antocianinas, taninos e ácidos fenólicos, possuem propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e pró-apoptóticas que podem neutralizar os radicais livres e proteger o DNA de danos. Quando utilizado em cotratamento, o extrato de romã mostrou um efeito modulador sobre a DXR, potencializando seus efeitos anticarcinogênicos (Santos; Orsolin; Lahlou, 2018).

A DXR gera radicais livres que podem causar danos às células saudáveis, mas os antioxidantes presentes no extrato de romã provavelmente atenuaram esse efeito, neutralizando os radicais livres e reduzindo o estresse oxidativo. Isso pode ser atribuído à capacidade dos antioxidantes de prevenir a geração de radicais livres, neutralizar radicais livres produzidos de forma exógena e/ou endógena, e reparar os danos causados por eles. Além disso, os antioxidantes podem fortalecer o sistema antioxidante endógeno do corpo, incluindo sistemas

enzimáticos como superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase (Magalhães *et al.*, 2010).

Os antioxidantes presentes no extrato de romã fortalecem o sistema antioxidante endógeno através da indução de enzimas antioxidantes, ativação de vias de sinalização antioxidantes, manutenção dos níveis de glutathione, regeneração de outros antioxidantes, quelação de metais de transição e redução da inflamação. Este fortalecimento do sistema antioxidante endógeno contribui para a proteção das células contra os danos causados por radicais livres e estresse oxidativo, desempenhando um papel crucial na prevenção de doenças crônicas, incluindo o câncer (Barbosa *et al.*, 2010). Tais explicações na literatura utilizando extratos de origem vegetal, como a romã por exemplo, podem justificar como o extrato de lúpulo, por ser uma substância rica em fitoquímicos, agiria frente a indução tumoral.

Tabela 1. Frequência de clones de tumores observados em diferentes segmentos de *Drosophila Melanogaster*, heterozigota para o gene supressor de tumor *wt^s*, tratadas com os diferentes extratos de Lúpulo a 2000 µg/mL⁻¹. Os controles utilizados foram Doxorrubicina (DXR) 0,4 mM, água de osmose reversa.

Extratos: Eld – El dorado, Ekua – Ekuanot, Herc – Hércules; Métodos de extração: AF – À Frio; AM – Agitação Magnética; US – Ultrassom.

Controle positivo (+): DXR – Doxorrubicina; Controle negativo (-): Água.

	TRATAMENTO				Nº mosca	Nº DE TUMORES ANALISADOS							Frequência
	Eld. µg mL ⁻¹	Ekua. µg mL ⁻¹	Herc. µg mL ⁻¹	DXR mM		Olhos	Cabeça	Asas	Corpo	Pernas	Halter	Total	
-	0	0	0	0	100	0.02(2)	0.04(4)	0.0(00)	0.01(1)	0.02(2)	0.00(0)	18	0.18
+	0	0	0	0.4	100	0.02(2)	0.37(37)	0.03(3)	0.49(49)	0.02(2)	0.04(4)	97	0.97*
I S O L A D O	2000 AF	0	0	0	100	0.00(0)	0.00(0)	0.01(1)	0.06(6)	0.00(0)	0.00(0)	07	0.07
	2000 AM	0	0	0	100	0.00(0)	0.00(0)	0.03(3)	0.03(3)	0.00(0)	0.00(0)	06	0.06
	2000 US	0	0	0	100	0.00(0)	0.00(0)	0.02(2)	0.02(2)	0.00(0)	0.00(0)	04	0.04
	0	2000 AF	0	0	100	0.00(0)	0.01(1)	0.04(4)	0.06(6)	0.01(1)	0.00(0)	12	0.12
	0	2000 AM	0	0	100	0.00(0)	0.01(1)	0.01(1)	0.10(10)	0.00(0)	0.00(0)	12	0.12
	0	2000 US	0	0	100	0.01(1)	0.02(2)	0.06(6)	0.08(8)	0.00(0)	0.00(0)	17	0.17
	0	0	2000 AF	0	100	0.00(0)	0.00(0)	0.01(1)	0.07(7)	0.07(7)	0.00(0)	15	0.15
	0	0	2000 AM	0	100	0.01(1)	0.04(4)	0.06(6)	0.05(5)	0.03(3)	0.00(0)	19	0.19
	0	0	2000 US	0	100	0.01(1)	0.02(2)	0.01(1)	0.11(11)	0.01(1)	0.00(0)	16	0.16

Diagnóstico estatístico de acordo com o Teste Mann-Whitney. Nível de significância $p < 0,05$.

* Valor considerado diferente do controle negativo ($p < 0,05$). ** Valor considerado diferente do controle positivo ($p < 0,05$)

Ao avaliar os indivíduos de *D. melanogaster* tratados com os três extratos, associados à DXR, na forma de co-tratamento, ou seja, de forma simultânea, os resultados foram expressos na Tabela 2, e têm-se as seguintes frequências tumorais: El dorado 0,09, 0,07 e 0,08; Ekuanot 0,12, 0,07 e 0,13; e Hércules 0,11, 0,09 e 0,14 tumores/mosca. Em paralelo, a porcentagem de inibição de tumores ficou respectivamente como: El dorado 90,7%, 92,8% e 91,7%; Ekuanot 87,6%, 92,8% e 86,6%; e Hércules 90,7%, 85,6% e 85,6%. Nota-se que esse percentual de inibição foi alto, mostrando que os extratos desempenharam um importante papel na redução dos tumores. As moscas tratadas apenas com a DXR (controle positivo) apresentaram uma frequência de 0,97 tumores/mosca.

Com estas evidências, pode-se notar uma redução, estatisticamente significativa ($p < 0,05$), na frequência de tumores induzidos pela DXR. Isto sugere que estes extratos podem apresentar uma atividade moduladora sobre a DXR, possivelmente conseguindo atenuar a ação carcinogênica da mesma. Outra hipótese é que os extratos induziram apoptose nas células tumorais, o que resultou na redução da formação de tumores nos indivíduos adultos. Pode-se observar também que, mesmo sendo extratos obtidos por metodologias distintas, os resultados apresentados foram similares, não havendo diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os valores da frequência tumoral.

Karabin *et al.* (2015) atribuíram que um dos mecanismos de ação dos flavonoides está ligado à inibição da ativação metabólica de pró-carcinógenos. Flavonoides podem estimular as enzimas de desintoxicação de carcinógenos, ajudando na sua metabolização e excreção. Foi visto também que, nos estágios avançados do crescimento tumoral, os flavonoides suprimiram o processo ao inibir a síntese de DNA, reduzindo angiogênese e induzindo a apoptose das células tumorais.

Almeida & Conto (2024) citam em seu estudo que o lúpulo é rico em flavonoides, e dentre eles, os principais são o xantohumol, isoxantohumol, desmethyloxantohumol, 6-prenilnaringenina, 8-prenilnaringenina e 6-geranilnaringenin. Estes compostos estão ligados a algumas propriedades biológicas, dentre os benefícios a saúde estão as propriedades antioxidantes e prevenção contra o câncer. Bolton *et al.* (2019), em sua publicação, apresentou as várias propriedades anticarcinogênicas do xantohumol *in vitro* nos estágios carcinogênicos, nas fases de iniciação, promoção e progressão. O xantohumol juntamente com 8-prenilnaringenina também pode agir contra espécies reativas de oxigênio, consequentemente, prevenindo o estresse oxidativo celular que poderiam acarretar danos às proteínas e ao DNA.

Astray *et al.* (2020) avaliaram a ação antiproliferativa de xantohumol, xantohumol C e extrato bruto de lúpulo em células de câncer de mama humano, e após dois dias de incubação,

o composto que apresentou a inibição de crescimento mais evidente foi o xantohumul C, seguido do extrato bruto, e por último o xantohumul. Em outro estudo, Oliveira, Souza e Magalhães-Guedes (2022) mostraram que o xantohumul é capaz de inibir a atividade da enzima CYP1A de fase 1, prevenindo assim a fase inicial da carcinogênese. Além disso, o xantohumul é um indutor de NADH (quinona redutase), que sensibiliza alguns metabólitos pró-carcinógenos indutores, como a atividade de algumas enzimas da família do citocromo P450 (CYP1B1, CYP1A1, CYP3A4, CYP2E1) e inibe a ação do 7-etoxiresorufina-O-desetilase (EROD), que são enzimas de oxidação e metabolização, respectivamente.

Magalhães *et al.* (2010) apontaram que a atividade do xantohumul e como ele modula a enzima do citocromo P450, que está envolvida na ativação metabólica de pró-carcinogênicos. Outro mecanismo de ação do xantohumul é a prevenção da carcinogênese. Ele faz isso inibindo a síntese de DNA e induzindo a apoptose, além de interromper o ciclo celular na fase S e promover a diferenciação celular terminal.

Já Cömert Önder *et al.* (2016) examinou a antiproliferação de extratos de 6 variedades de *H. lupulus* em linhas celulares de hepatocarcinoma (Hep3B) e adenocarcinoma de cólon humano (HT-29), e os efeitos inibitórios enzimáticos destes extratos brutos. Os autores observaram que o extrato de metanol-1 (0,6-1 mg/mL) inibiu a proliferação celular dependente do tempo (48/72 horas) nas células Hep3B com 70% de inibição, porém a atividade inibitória não foi notada em células de câncer de cólon humano. Já o extrato de acetona (0,1 mg/mL), aumentou a proliferação celular em doses baixas, em 72 horas, nas células Hep3B e 48/72 horas em células HT29. Tais efeitos foram comparados a partir de valores relativos de atividade máxima utilizando enzimas como α -quimotripsina, tripsina e papaína, tirosinase e β -lactamase (penicilinase). Analisando os resultados na presente pesquisa, observa-se que as porcentagens de inibição de tumores foram superiores aos encontrados no trabalho mencionado, chegando a ser superiores a 85%. Isso pode ter ocorrido devido a concentração utilizada de $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ e também sendo extratos aquosos, onde não foi utilizado nenhum outro solvente como na pesquisa acima citada.

Sabe-se que o lúpulo apresenta um grande potencial anticancerígeno, mas sua atividade moduladora ainda é pouco conhecida. Em estudo de Salvati *et al.*, (2019) apresentou que os ácidos amargos ou alfa-ácidos contidos no extrato de *pellets* de lúpulo possuem atividade moduladora que potencializou a função das células Natural Killer (NK), por haver um sinergismo com interleucinas (IL-2 e IL-15), regulando de forma positiva o receptor ativador de Nkp44 nas superfícies das células NK. Como resultado, houve o aumento da exocitose de

grânulos e citotoxicidade contra células tumorais, sugerindo que as frações desses ácidos amargos sirvam como um co-estimulador de células NK.

Korpelainen & Pietiläinen (2021) analisaram que a humulona (alfa-ácido) teve a capacidade de inibir o desenvolvimento do câncer de pele em camundongos, devido à diminuição das quantidades do fator de ligação ao DNA (NF-kB) e da proteína ativadora AP-1, que são fatores de transcrição que regulam a expressão de genes envolvidos na inflamação, crescimento celular e sobrevivência celular. A redução desses fatores leva à inibição de vias de sinalização que promovem a proliferação celular e a inflamação, resultando em um efeito anticarcinogênico (Blanco; Condino Neto, 2003). Os resultados encontrados na presente pesquisa corroboram com aqueles obtidos pelos no trabalho mencionado acima, visto que os extratos aquosos das variedades do lúpulo apresentaram efeito modulador frente a DXR, protegendo o DNA do organismo modelo contra as mutações causadas pela DXR. De acordo com a literatura, citada acima, essa proteção pode ser conferida devido a presença de fitoquímicos com atividade antioxidante, agindo como sequestradores dos radicais livres causados pela DXR, protegendo de danos e a formação do tumor.

Ao analisar o pré-tratamento, ao quais as moscas foram submetidas previamente aos três extratos trabalhados – El dorado, Ekuanot e Hércules, e após 6 horas (tratamento agudo) foi adicionado a DXR. Os resultados foram expressos na Tabela 2, e tem-se as seguintes frequências tumorais: El dorado 0,27, 0,22 e 0,11; Ekuanot 0,07, 0,10 e 0,15; e Hércules 0,24, 0,17 e 0,18 tumores/mosca. As porcentagens de inibição de tumores, ficaram respectivamente como: El dorado 72,1 %, 77,3% e 88,6%; Ekuanot 92,8%, 89,7% e 84,5%; e Hércules 75,2%, 82,5% e 81,4%. Estes resultados de forma similar ao ocorrido no co-tratamento, se mostraram sutis, expondo que os extratos desempenharam relevante função protetora sob organismos modelo.

Tabela 2. Frequência de clones de tumores observados em diferentes segmentos de *Drosophila Melanogaster*, heterozigota para o gene supressor de tumor wts, tratadas com os diferentes Extrato de Lúpulo a 2000 µg/mL⁻¹ associados a Doxorubicina. Os controles utilizados foram Doxorubicina (DXR) 0,4 mM, água de osmose reversa.

Extratos: Eld – El dorado, Ekua – Ekuanot, Herc – Hércules; Métodos de extração: AF – À Frio; AM – Agitação Magnética; US – Ultrasson.

Controle positivo (+): DXR – Doxorubicina; Controle negativo (-): Água.

	TRATAMENTO				Nº mosca	Nº DE TUMORES ANALISADOS							Frequência	Inibição %
	Eld. µg mL ⁻¹	Ekua. µg mL ⁻¹	Herc. µg mL ⁻¹	DXR mM		Olhos	Cabeça	Asas	Corpo	Pernas	Halter	Total		
-	0	0	0	0	100	0.02(2)	0.04(4)	0.0(00)	0.01(1)	0.02(2)	0.00(0)	18	0.18	-
+	0	0	0	0.4	100	0.02(2)	0.37(37)	0.03(3)	0.49(49)	0.02(2)	0.04(4)	97	0.97*	-
C O - T T O	2000 AF	0	0	0.4	100	0.00(0)	0.01(1)	0.02(2)	0.06(6)	0.00(0)	0.00(0)	09	0.09**	90.7
	2000 AM	0	0	0.4	100	0.01(1)	0.01(1)	0.02(2)	0.03(3)	0.00(0)	0.00(0)	07	0.07**	92.8
	2000 US	0	0	0.4	100	0.00(0)	0.00(0)	0.02(2)	0.06(6)	0.00(0)	0.00(0)	08	0.08**	91.7
	0	2000 AF	0	0.4	100	0.00(0)	0.01(1)	0.03(3)	0.08(8)	0.00(0)	0.00(0)	12	0.12**	87.6
	0	2000 AM	0	0.4	100	0.02(2)	0.00(0)	0.01(1)	0.04(4)	0.00(0)	0.00(0)	07	0.07**	92.8
	0	2000 US	0	0.4	100	0.00(0)	0.01(1)	0.02(2)	0.10(10)	0.00(0)	0.00(0)	13	0.13**	86.6
	0	0	2000 AF	0.4	100	0.00(0)	0.01(1)	0.02(2)	0.08(8)	0.00(0)	0.00(0)	11	0.11**	88.6
	0	0	2000 AM	0.4	100	0.01(1)	0.01(1)	0.02(2)	0.05(5)	0.00(0)	0.00(0)	09	0.09**	90.7
	0	0	2000 US	0.4	100	0.00(0)	0.04(4)	0.03(3)	0.07(7)	0.00(0)	0.00(0)	14	0.14**	85.6
P R É - T T O	2000 AF	0	0	0.4	100	0.00(0)	0.08(8)	0.11(11)	0.06(6)	0.02(2)	0.00(0)	27	0.27**	72.1
	2000 AM	0	0	0.4	100	0.00(0)	0.00(0)	0.01(1)	0.13(13)	0.08(8)	0.00(0)	22	0.22**	77.3
	2000 US	0	0	0.4	100	0.01(1)	0.00(0)	0.01(1)	0.04(4)	0.05(5)	0.00(0)	11	0.11**	88.6
	0	2000 AF	0	0.4	100	0.00(0)	0.00(0)	0.02(2)	0.04(4)	0.01(1)	0.00(0)	07	0.07**	92.8
	0	2000 AM	0	0.4	100	0.02(2)	0.00(0)	0.03(3)	0.04(4)	0.01(1)	0.00(0)	10	0.10**	89.7
	0	2000 US	0	0.4	100	0.00(0)	0.00(0)	0.07(7)	0.07(7)	0.01(1)	0.00(0)	15	0.15**	84.5
	0	0	2000 AF	0.4	100	0.02(2)	0.04(4)	0.02(2)	0.15(15)	0.01(1)	0.00(0)	24	0.24**	75.2
	0	0	2000 AM	0.4	100	0.00(0)	0.01(1)	0.03(3)	0.09(9)	0.04(4)	0.00(0)	17	0.17**	82.5
	0	0	2000 US	0.4	100	0.00(0)	0.02(2)	0.00(0)	0.15(15)	0.01(1)	0.00(0)	18	0.18**	81.4

Diagnóstico estatístico de acordo com o Teste Mann-Whitney. Nível de significância $p < 0,05$.

* Valor considerado diferente do controle negativo ($p < 0,05$). ** Valor considerado diferente do controle positivo ($p < 0,05$).

Considerando o controle positivo, foi observada uma frequência tumoral de 0,97 tumores/mosca. Estatisticamente, houve diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle negativo. A comparação dos extratos com o controle positivo indicou um efeito protetor, sugerindo que os extratos têm a capacidade de proteger as células somáticas de *D. melanogaster* dos efeitos nocivos da DXR. De forma similar aos resultados anteriores, os extratos obtidos por metodologias distintas não apresentaram discrepância significativas entre os valores da frequência tumoral.

Uma pesquisa utilizando camundongos mostrou que a humulona apresentou três atividades distintas: inibiu a inflamação causada por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), inibiu o efeito promotor tumoral do TPA na formação de tumor de pele e impediu o edema do ouvido estimulado pelo ácido araquidônico (Yasukawa; Takeuchi; Takido, 1995). Esse efeito protetor dos constituintes do lúpulo, como a humulona, pode justificar o efeito protetor observado nas *D. melanogaster* no presente estudo.

Wei *et al.* (2018) relataram que o xantohumol induziu um desequilíbrio entre os antioxidantes intracelulares, como a superóxido dismutase, e a produção de radicais livres, amplificando a ação apoptótica, antimetastática e antiproliferativa do composto. Girisa *et al.* (2021) mostraram que o potencial anticancerígeno do lúpulo está associado a diversas vias de sinalização (Akt, AMPK, ERK, IGFBP2, NF- κ B e STAT3) e à regulação de proteínas específicas (Notch1, caspases, MMPs, Bcl-2, ciclina D1), além da modificação de marcadores de estresse oxidativo, miRNAs e proteínas supressoras de tumores. As substâncias presentes no lúpulo, devido à sua alta atividade antioxidante, podem intervir em vias de sinalização e regulação, o que pode ocorrer a partir da atividade de radicais livres e do consequente estresse oxidativo.

No contexto do tratamento associado à DXR, os extratos mostraram um efeito modulador. Pode ser que, juntamente com a DXR, os extratos sequestram radicais livres, reduzindo os danos iniciais. Alternativamente, após a DXR causar danos, os extratos podem ativar proteínas das vias de apoptose, induzindo a morte das células tumorais.

No pré-tratamento, os extratos demonstraram um efeito protetor significativo. Este efeito pode estar relacionado à proteção contra a perda de heterozigose do gene supressor tumoral, *wts*. Essa proteção impede que as células iniciais sofram mutações que levariam à formação de tumores, mostrando a eficácia dos extratos em prevenir o processo de carcinogênese antes que ele ocorra.

Com base na literatura analisada, pode-se validar com o presente estudo que os extratos de lúpulo apresentaram três tipos de ação: anticarcinogênica, moduladora e protetora, sob a

influência da DXR em células somáticas. Estas atividades podem ser atribuídas ao fato de os extratos serem ricos em substâncias com alto poder antioxidante.

4 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que o lúpulo rico em alfa-ácidos apresenta um grande potencial contra o câncer. Nos testes realizados, foi verificado que houve uma ação anticarcinogênica, moduladora e protetora destes extratos, observando a notória redução de tumores nas células somáticas do organismo modelo, a *D. melanogaster*.

No cenário atual os alfa-ácidos tem como principal atribuição a indústria cervejeira, mas, esse composto tem vasta capacidade de agir como um composto que auxilie no tratamento do câncer, e por isso, se faz necessário novos estudos, utilizando novas dosagens, outros organismos modelos, para entender mais sobre seus mecanismos de ação. Assim, os derivados do lúpulo podem exercer um papel importante na terapêutica do câncer, com intuito de agir como adjunto na medicina oncológica e nos protocolos quimioterápicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, A. R.; CONTO, L. C. Lúpulo no Brasil: Uma cultura promissora em ascensão. **Food Science Today**, v. 3, n. 1, p. 1-6, 2024.
- AMARAL, M. V. F.; REIS, E. A.; ORSOLIN, P. C. Avaliação do efeito carcinogênico do bromazepam em *Drosophila melanogaster*. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 20, n. 4, p. 526-532, 2021.
- 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.
- ASTRAY G, *et al.* *Humulus lupulus* L. como fonte natural de biomoléculas funcionais. **Ciências Aplicadas**. v. 10, n. 15, p. 5074, 2020. <https://doi.org/10.3390/app10155074>
- BARBOSA, K. B. F. *et al.* Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732010000400013>
- 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.
- BLANCO, M. L.; CONDINO NETO, A. O fator nuclear Kappa B: uma nova perspectiva para o estudo de drogas antiinflamatórias. **Revista de Ciências Médicas**, [S. l.], v. 12, n. 4, 2003. Disponível em: <https://seer.sis.puc-campinas.edu.br/cienciasmedicas/article/view/1250>.
- BOLTON, J. L. *et al.*, The Multiple Biological Targets of Hops and Bioactive Compounds. **Chem Res Toxicol**, v.32, n. 2, p. 222-233, 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.8b00345>
- BONTEMPO, N. J. S.; ORSOLIN, P. Efeito anticarcinogênico do Gerioox® em *Drosophila melanogaster*. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.14 n.26; p. 318-327, 2017.
- BRANDÃO, D. C. *et al.* *Arrabidaea chica* chloroform extract modulates estrogen and androgen receptors on luminal breast cancer cells. **BMC Complement Med Ther** 22, n. 18, 2022.
- BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.
- CHABNER, B. A.; CALABRESI, P. Quimioterapia das doenças neoplásicas. In: GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: Mac Grawhill, 9. ed, p. 903-907, 1996.
- CHAVES, R. A. Q.; RAMOS, M. P. O. Avaliação do efeito carcinogênico e/ou

anticarcinogênico do látex de *Himatanthus obovatus* em células somáticas de *Drosophila melanogaster* e o teor de sua atividade antioxidante, flavonoides totais e taninos totais. **Perquirere**, v. 20, n. 2, p. 26-42, 2023.

CÖMERTÖNDER, F. *et al.* Antiproliferative activity of *Humulus lupulus* extracts on human hepatoma (Hep3B), colon (HT-29) cancer cells and proteases, tyrosinase, β -lactamase enzyme inhibition studies. **J Enzyme Inhib Med Chem**. v. 31, n. 1, p. 90-98, 2016.

COSTA, W. F. *et al.* Lapachol como agente inibidor de tumor epitelial em heterozigoto de *Drosophila melanogaster* para o gene supressor tumoral *wt*s. **Genet. Mol. Res.** v.10, n. 4, p. 3236-3245, 2011.

DORNELAS, C. A.; MORAES FILHO, M. O. Carcinogênese experimental de bexiga e o índice de carcinogênese. **E-book**. Fortaleza: Imprensa Universitária, p. 182, 2016. Acesso em: 15 out. 2023. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/19467>.

DURELLO, R. S.; SILVA, L. M.; BOGUSZ, S. Química do lúpulo. **Química Nova**, v. 42, p. 900-919, 2019.

ELROD, S. M. *et al.* Relationship between Phenolic and Antioxidant Concentration of *Humulus lupulus* and Alpha Acid Content. **Journal Of The American Society Of Brewing Chemists**, v. 77, n. 2, p. 134-139, 3 abr. 2019.

FERREIRA, R. H. *et al.* Inovação na fabricação de cervejas especiais na região de Belo Horizonte. **Perspectivas em Ciência da Informação**, [S.L.], v. 16, n. 4, p. 171-191, 2011.

FIGUEIREDO, B. Q. *et al.* Avaliação de efeito anticarcinogênico da cebola (*Allium cepa*) em *Drosophila melanogaster*. **Revista Perquirere**, v. 20, n. 1, 2023.

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.

FURTADO, R. R. & LOPES, J. C. Avaliação do efeito carcinogênico e anticarcinogênico do extrato aquoso de kiwi (*Actinidia deliciosa*) por meio do teste (*warts*) em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. **Revista Perquirere**, v. 16, n. 1, 2019.

GIRISA, S. *et al.* Xanthohumol from Hop: Hope for cancer prevention and treatment. **IUBMB Life**, v. 73, n. 8, p. 1016–1044, 2021.

GUAN, G.; LAN, S. Implications of Antioxidant Systems in Inflammatory Bowel Disease. **BioMed Research International**. 2018.

GUIM, C. C. G. **Análise do óleo essencial de *Origanum majorana* relacionada ao seu potencial tóxico e antineoplásico**. Tese (Doutorado) Programa de Pós-Graduação em Veterinária - Universidade Federal de Pelotas, 2022.

GUIMARÃES, B. P. **Avaliação do lúpulo (*Humulus lupulus* L.) cultivado no Distrito Federal para uso cervejeiro**. Dissertação de mestrado, Instituto de Química Programa de Pós-Graduação em Química. Brasília, 2021.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radical sinbiology and medicine**. 3.ed. Nova Iorque: Claredon Press,Oxford, 2000.

HUSSAIN, A. I. *et al.* Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. **Food Chem.** v. 108, n. 3, p. 986–995, 2008.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (BRASIL). **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer / Instituto Nacional de Câncer**. – Rio de Janeiro: Inca, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (BRASIL). **Ambiente, trabalho e câncer: aspectos epidemiológicos, toxicológicos e regulatórios / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva**. – Rio de Janeiro: Inca, 2021.

JASKULA-GOIRIS, B. *et al.* The Use of Hop Polyphenols during Brewing to Improve Flavor Quality and Stability of Pilsner Beer. *Journal Of The American Society Of Brewing Chemists*, [S.L.], v. 72, n. 3, p. 175-183, 2014.

KARABIN, Marcel *et al.* Biotransformations and biological activities of hop flavonoids. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 6, p. 1063-1090, 2015.

KORPELAINEN, H.; PIETILÄINEN, M. Hop (*Humulus lupulus* L.): Traditional and Present Use, and Future Potential. **Econ Bot**, v. 75, p. 302–322, 2021.

KROFTA, K. *et al.* Antioxidant Characteristics of Hops and Hop Products. **Journal Of The Institute Of Brewing**, [S.L.], v. 114, n. 2, p. 160-166, 2008.

KUMAR S.; PANDEY, A. K. Free Radicals: Health Implications and their Mitigation by Herbals. **Journal of Advances in Medicine and Medical Research**, v. 7, n. 6, p. 438-457, 2015.

LELA, L. *et al.* Nanotechnological exploitation of the antioxidant potential of *Humulus lupulus* L. extract. **Food Chemistry**, p. 133401, 2022.

LIBÓRIO, F. H. D. M.; FELIPE, D. F.; BIDO, G. D. S. **Plantas medicinais e seu potencial anticarcinogênico**. XI EPCC - Encontro Internacional de Produção Científica, 2019.

LIMA, P. M. A. P. *et al.* Efeitos de um refrigerante carbonatado na incidência de tumor epitelial em *Drosophila melanogaster*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 6, p. 240-247, 2018.

LIU, M. *et al.* Pharmacological profile of xanthohumol, a prenylated flavonoid from hops (*Humulus lupulus*). **Molecules**, v. 20, n. 1, p. 754-779, 2015.

MAGALHAES, P. J. *et al.* Aspectos esenciales y beneficios para la salud del xantohumol, un producto natural derivado del lúpulo y la cerveza. **Cerveza y malta**. v. 4, n. 188, p. 41-51, 2010.

MEDEIROS, L. F. C. **Formulação de protetor solar natural a partir da incorporação do extrato da folha de *Humulus lupulus***. Monografia (Graduação em Farmácia) - Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2023.

MENINA LUPULINA - **Água, Malte, Lúpulo e Conteúdo**. 23 de outubro de 2018. Disponível em: <<https://meninalupulina.blogspot.com/>> Acesso em: 25 fevereiro 2024.

MORAIS, C. R.; B. *et al.* **Potencial toxicogenético de inseticidas neonicotinoides em diferentes sistemas *in vivo***. Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica, Biotecnologia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019.

MOURATIDIS, P.X.E. *et al.* An investigation into the anticancer effects and mechanism of action of hop β -acid lupulone and its natural and synthetic derivatives in prostate cancer cells. **Nutr. Cancer**, v. 65, n. 7, 1086–1092, 2013.

NASCIMENTO, F. M. G. **Principais constituintes de flores de lúpulo: análise do potencial antioxidante e para o tratamento de gota, diabetes do tipo 2 e doença de Alzheimer**. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza 2023.

NEPOMUCENO, J. C. Using the *Drosophila melanogaster* to Assessment Carcinogenic Agents through the Test for Detection of Epithelial Tumor Clones (*Warts*). **Adv. Tech Biol Med.**, [S.l.], v.3, n.3, 2015.

NETZEL, M. *et al.* Cancer cell antiproliferation activity and metabolism of black carrot anthocyanins. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.8, p.365-372, 2007.

NIKOLIC, D.; VAN BREEMEN, R. B. Analytical methods for quantitation of prenylated flavonoids from hops. **Current analytical chemistry**, v. 9, n. 1, p. 71-85, 2013.

OJHA, K. *et al.* A review on different methods of determination of antioxidant activity assay of herbal plants. **Research Journal of Life Sciences, Bioinformatics, Pharmaceutic and Chemical Sciences**, Bilaspur, v. 6, n. 4, p. 707-730, 2018.

OLIVEIRA, C. R.; SOUZA, C. O.; MAGALHÃES-GUEDES, K. T. Compostos antioxidante presentes na cerveja e sua relação com a saúde humana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos: o avanço da ciência no Brasil**. v. 1, 2022.

OLIVEIRA, M. C.; SCHOFFEN, J. P. F. Oxidative stress action in cellular aging. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 6, p. 1333-1342, 2010.

OLIVEIRA, V. B. *et al.* Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por clade de *Dicksonia sellowiana* (presl.). Hook, dicksoniaceae. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 18, p. 230-239, 2016.

ORSOLIN, P. *et al.* Efeito modulador da sinvastatina no dano ao DNA induzido pela doxorubicina em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. **Alimento Químico Toxicol.** n. 90, p. 10–17, 2016.

OYENIHI, A. B.; SMITH, C. Are polyphenol antioxidants at the root of medicinal plant anticancer success? **Journal of Ethnopharmacology**. v. 229, p. 54-72, 2019.

PALANISAMY, R. *et al.* Synergistic Anticancer Activity of Plumbagin and Xanthohumol Combination on Pancreatic Cancer Models. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 25, n. 4, p. 2340, 2024.

PETERS, J. M., GONZALEZ, F. J. The Evolution of Carcinogenesis. **Toxicol Sci**. v. 165, n. 2, p. 272-276, 2018.

PIRES, J. S. *et al.* Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu para extratos de algas. **Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo**, p. 1-5, set. 2017.

PIZZINO, G. *et al.* Oxidative Stress: harms and benefits for human health. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, [S.L.], v. 2017, p. 1-13, 2017.

PRIETO, P. *et al.* Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, [S.L.], v. 269, n. 2, p. 337-341, 1999.

ROCHA, L. B. *et al.* Avaliação do efeito carcinogênico do nifedipino em *Drosophila melanogaster*. **Revista Perquirere**, v. 19, n. 1, 2022.

ROCHA, N. A. M.; SOUSA, F. A.; MORAIS, C. R. Avaliação da capacidade carcinogênica de três marcas comerciais de leites industrializados, pelo teste para detecção de tumor epitelial em *Drosophila melanogaster*. **Revista GeTeC**, v. 7, n. 15, 2018.

SALVIATI, E. *et al.* Immunomodulatory activity of *Humulus lupulus* bitter acids fraction: Enhancement of natural killer cells function by NKp44 activating receptor stimulation. **Journal of functional foods**, v. 61, p. 103469, 2019.

SANTOS, B. D. A; ORSOLIN, P. C.; LAHLOU, N. B. 2018. Avaliação do potencial anticarcinogênico do extrato aquoso de romã (*Punica granatum* L.) por meio do teste para detecção de clones de tumores epiteliais (warts) em *Drosophila melanogaster*. **Rev. Saúde.com**, v. 4, n. 1, p. 1064-1072, 2018. DOI 10.22481/rsc.v14i1.522

SANTOS, F. C. **Variabilidade fenotípica de alfa ácido de lúpulo (*Humulus Lupulus* L) cultivados nas regiões do Brasil**. Tese de Doutorado. Universidade do Estado de Santa Catarina. 2020.

SANTOS, T. A. **Avaliação de Diferentes Métodos e Solventes de Extração Sobre a Composição Fenólica e Centesimal, Atividade Antimicrobiana e Citotóxica de Extratos dos Frutos da *Momordica charantia* L.**, p. 83, 2018 a.

SANTOS, V.A. **Estudo fitoquímico e atividade antioxidante do extrato e frações das folhas *Humulus lupulus* (Cannabaceae)**. Universidade Federal de Ouro Preto. Trabalho de conclusão de curso em farmácia. p. 14, 2018 b.

SCHAEFFER, G.; PEREIRA, G. G. **Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* das variedades de lúpulo Cascade e Teamaker cultivados no Brasil.** Instituto Federal do Espírito Santo, 2023.

SCIENCE OF BEER. **Lúpulo: um olhar químico sobre a planta e sua aplicação na cerveja.** 29 de janeiro 2020. Disponível em: <Lúpulo: um olhar químico sobre a planta e sua aplicação na cerveja (scienceofbeer.com.br)> Acesso em: 25 fevereiro 2024.

SHARPE, Joanne L. *et al.* Modelling Cancer Metastasis in *Drosophila melanogaster*. **Cells**, v. 12, n. 5, p. 677, 2023.

SIDOROV, R. A. *et al.* Indução de clones tumorais em *D. melanogaster wts/+* Heterozigotos com carcinógenos químicos. **Pesquisa de Mutação**, v. 498, n. 1-2, p. 181-91, 2001.

SILVA, A. R.; VASCONCELOS, M. A.; OLIVEIRA, R. G. S. Efeito modulador do gluconato de clorexidina em células epiteliais de *Drosophila melanogaster*. **Revista Animal em Foco**, v. 2, 2022.

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.

SILVA, V. M.; MARQUES, I. C.; ARAÚJO, B. C. Avaliação do potencial anticarcinogênico do extrato etanólico de *Piper amalago* em *Drosophila melanogaster*. **Revista Perquirere**, n. 18, p. 170-182, 2021. Disponível em: <<https://revistas.unipam.edu.br/index.php/perquirere/index>> Acesso em: 21 jan. 2024.

SKOMRA, U.; KOZIARA-CIUPA, M. Stability of the hop bitter acids during long-term storage of cones with different maturity degree. **Polish Journal of Agronomy**, v. 40, p. 16-24, 2020.

SOUSA, C. M. *et al.* Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química nova**, v.30, n.2, p. 351-355, 2007.

SOUSA, M. J. B. *et al.* **Avaliação do Potencial Genotóxico e Mutagênico de Extratos Padronizados de *Caesalpinia ferrea* (jucá) e *Brosimum gaudichaudii* (inharé).** 88 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação STRICTO SENSU em Genética) - Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia - GO. 2017.

SPÓSITO, M. B. *et al.* **A cultura do lúpulo.** Piracicaba: ESALQ - Divisão de Biblioteca, n. 68, 81 p. 2019.

STEVENS, J. F.; PAGE, J. E. Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health! **Phytochemistry**, v. 65, n. 10, p. 1317-1330, 2004.

SUCUPIRA, N. R. *et al.* Methods for Determining the Antioxidant Activity of Fruits. **Journal of Health Sciences**, v. 14, n. 4, 2012.

TANIGUCHI, Y. *et al.* Analysis of the components of hard resin in hops (*Humulus lupulus* L.) and structural elucidation of their transformation products formed during the brewing process. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 47, p. 11602-11612, 2014.

TZANAKAKIS G., *et al.* Proteoglycans and Immunobiology of Cancer—Therapeutic Implications. **Front. Immunol.** v. 10, p. 875, 2019.

VALKO, M. *et al.* Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem Biol Interact.** v. 160, n. 1, p. 1-40, 2006.

VASCONCELOS, M. A. *et al.* Assessment of the carcinogenic potential of high intensens weeteners through the test for detection of epithelial tumor clones (warts) in *Drosophila melanogaster*. **Food and Chemical Toxicology**, v.101, p. 1-7, 2017.

VELLOSA, J. C. R. *et al.* E. Oxidative stress: an introduction to the state of the art. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 1, p. 10152-10168, 2021.

WANG, H. *et al.* Plants vs. Cancer: A Review on Natural Phytochemicals in Preventing and Treating Cancers and Their Druggability. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v.12, n.10, p.1281-1305, 2012.

WEI, S. *et al.* Xanthohumol, a prenylated flavonoid from Hops, exerts anticancer effects against gastric cancer *in vitro*. **Oncol. Rep.** v. 40, n. 6, p. 3213–3222, 2018.

YASUKAWA, K.; TAKEUCHI, M.; TAKIDO, M. Humulon, a bitter in the hop, inhibits tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin. **Oncology**. v. 52, n. 2, p. 156-158, 1995.

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

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.

ANEXOS

ANEXO A – Planilha Frequência de Tumores *wt*s em *Drosophila melanogaster*

 	DOCUMENTO AVULSO	DA - 8.2
	Planilha de Análise <i>wt</i> s	Revisão: 2

Frequência de Tumores *wt*s em *Drosophila melanogaster*

Experimento:
Concentração:
Cruzamentos:

Mosca	Oito	Cabeça	Asa	Corpo	Perna	Halteres	Total
1							0
2							0
3							0
4							0
5							0
6							0
7							0
8							0
9							0
10							0
11							0
12							0
13							0
14							0
15							0
16							0
17							0
18							0
19							0
20							0
21							0
22							0
23							0
24							0
25							0
26							0
27							0
28							0
29							0
30							0
31							0

ANEXO B – NORMAS DA REVISTA BJD (Brazilian Journal of Development) PARA SUBMISSÃO DO ARTIGO CIENTÍFICO

Submission Preparation Checklist

As part of the submission process, authors are required to check off their submission's compliance with all of the following items, and submissions may be returned to authors that do not adhere to these guidelines.

A contribuição é original e inédita, e não está sendo avaliada para publicação por outra revista; caso contrário, deve-se justificar em "Comentários ao editor".

The contribution is original and unpublished, and is not being evaluated for publication by another journal; Otherwise, it should be justified in "Comments to the editor".

O arquivo da submissão está em formato Microsoft Word, OpenOffice ou RTF.

The submission file is in Microsoft Word, OpenOffice or RTF format.

URLs para as referências foram informadas quando possível.

URLs for referrals were informed when possible.

O texto está em espaço simples; usa uma fonte de 12-pontos; emprega itálico em vez de sublinhado (exceto em endereços URL); as figuras e tabelas estão inseridas no texto, não no final do documento na forma de anexos.

The text is in simple space; Uses a 12-point font; Uses italic instead of underlining (except URL addresses); The figures and tables are inserted in the text, not at the end of the document in the form of attachments.

O texto segue os padrões de estilo e requisitos bibliográficos descritos em Diretrizes para Autores, na página Sobre a Revista.

The text follows the style standards and bibliographic requirements described in Guidelines for Authors, on the About Journal page.

Em caso de submissão a uma seção com avaliação pelos pares (ex.: artigos), as instruções disponíveis em Assegurando a avaliação pelos pares cega foram seguidas.

In case of submission to a peer-reviewed section (eg articles), the instructions available under Ensuring blind peer evaluation were followed.

Author Guidelines

The BJD accepts only original articles, not published in other journals. Articles presented at events are accepted, provided that this information is made available by the authors.

The rules for formatting and preparing originals are:

- Maximum of 20 pages and 8 authors;
- Font Times New Roman, size 12, line spacing of 1.5;
- Figures, Charts and Tables must appear together with the text, editable, in font 10, both for the content and for the title (which must appear just above the graphic element) and font (which must appear just below the graphic element).
- Title in Portuguese and English, at the beginning of the file, with font 14;
- Summary and abstract, along with keywords and keywords, with single spacing, just below the title;
- The file sent must not contain the identification of the authors.

This journal adopts as an editorial policy the guidelines for good practices in scientific publication of the National Association for Research and Postgraduate Studies in Administration (ANPAD), available at: http://www.anpad.org.br/diversos/boas_praticas.pdf.

Publication Fee

This journal does not charge a submission fee for articles;

- This journal charges a fee for publishing articles, in the amount of:

R\$ 490,00 (reais) per article to be published - for Brazilians.

₹ 1.500,00 (indian rupees) per article to be published - for Indians.

\$ 150.00 (american dollars) per article to be published - for other nationalities.

Privacy Statement

- The content of the articles is the sole responsibility of the authors.
- The total or partial reproduction of the content of the articles is allowed, provided the source is mentioned.
- Articles with plagiarism will be refused, and the author of the plagiarism will lose the right to publish in this magazine.
- The names and addresses informed in this journal will be used exclusively for the services provided by this publication and are not available for other purposes or to third parties.
- Once you submit the articles, the authors give the copyright of their articles to the BJD. If you regret the submission, the author has the right to ask the BJD not to publish his article. However, this request must occur within two months before the release of the number that the article will be published.
- The BJD uses the Creative Commons CC BY license. Information about this license can be found at: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>