



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

FRANCISCO MATEUS GOMES DO NASCIMENTO

**PRINCIPAIS CONSTITUINTES DE FLORES DE LÚPULO: ANÁLISE DO
POTENCIAL ANTIOXIDANTE E PARA O TRATAMENTO DE GOTA, DIABETES
DO TIPO 2 E DOENÇA DE ALZHEIMER**

FORTALEZA

2023

FRANCISCO MATEUS GOMES DO NASCIMENTO

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 apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Química. Área de concentração: Química Orgânica.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Teresa Salles Trevisan.

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- N195p Nascimento, Francisco Mateus Gomes do.
Principais constituintes de flores de lúpulo: análise do potencial antioxidante e para o tratamento de gota, diabetes do tipo 2 e doença de Alzheimer / Francisco Mateus Gomes do Nascimento. – 2023.
77 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2023.
Orientação: Prof. Dr. Maria Teresa Salles Trevisan.
1. Lúpulo. 2. Ácidos amargos. 3. Xanthohumol. 4. Potencial antioxidante. 5. Inibição enzimática. I.
Título.

CDD 540

FRANCISCO MATEUS GOMES DO NASCIMENTO

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 apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Química. Área de concentração: Química Orgânica.

Aprovada em: 13/07/2023.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra Maria Teresa Salles Trevisan (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Gilvandete Maria Pinheiro Santiago
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Telma Leda Gomes de Lemos
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Samuel Pedro Dantas Marques
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE)

Dedico este trabalho a minha noiva, ao meu irmão, a minha mãe e a minha avó, por sempre acreditarem em mim e por todo apoio nessa caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha noiva, Andreia Pinheiro, ao meu irmão, Júlio Gomes, à minha mãe, Virgínia Gomes, e à minha avó, Lúcia Gomes, por sempre estarem ao meu lado nos momentos que pensei que não seria capaz de alcançar meus objetivos. Eu amo todos vocês com todas as minhas forças!

Agradeço também à professora Dra. Maria Teresa, por ter me recebido de braços abertos e por toda compreensão na minha orientação durante essa caminhada. E ao professor Dr. Samuel Pedro, por todo acompanhamento e conselhos durante o curso.

Agradeço ao meu amigo Lucas Ramos, que durante esse período de mestrado me ensinou muito sobre os procedimentos experimentais e tratamento de dados estatísticos, dedico este trabalho a você também meu amigo. Que Deus te abençoe sempre!

Agradeço aos meus amigos de laboratório, professor Carlos Eduardo e Thales, por todos os conselhos e pelos momentos que me auxiliaram nos procedimentos químicos.

As professoras Gilvandete Maria e Telma Leda por todas as sugestões visando melhorar este trabalho. Suas impressões e conselhos foram essenciais para melhorar essa dissertação.

Agradeço também à todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa.

Agradeço à FUNCAP pelo financiamento desta pesquisa, mas também as agências de fomento CAPES e CNPq pelo auxílio a todos os pesquisadores do Brasil.

RESUMO

Humulus lupulus Linnaeus (lúpulo) é uma espécie vegetal rica em compostos fenólicos, utilizada no processo de fabricação da cerveja, que apresenta uma variedade de metabólitos secundários como ácidos amargos, flavonoides, ácidos fenólicos, óleos essenciais dentre outras substâncias. Baseando-se no exposto essa pesquisa tem como objetivo analisar o potencial antioxidante do lúpulo e verificar suas propriedades farmacológicas para auxiliar o tratamento da gota, diabetes do tipo 2 e doença de Alzheimer, e o estudo de quantificação dos compostos majoritários presentes em suas flores. Variedades de flores de lúpulo com plantio no Brasil e pellets comerciais foram obtidos e os extratos produzidos por extração soxhlet (em hexano e metanol). A quantificação dos ácidos amargos e xanthohumol foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As cultivares Herkules e Chinook-1 apresentaram os maiores teores de ácidos amargos e xanthohumol. A determinação do Teor de Fenólicos Totais evidenciou resultados significativos para as variedades Saaz, Chinook-2, Chinook-1 e Herkules. Corroborando com os resultados obtidos da análise do Teor de Fenólicos Totais, as variedades Chinook-2 e Saaz apresentaram as melhores atividades antioxidantes no ensaio DPPH[•] dentre os extratos em metanol, e as variedades Herkules e Chinook-1 dentre os extratos em hexano, confirmando a elevada ação dos ácidos amargos, conforme foi observado para o ICE-4, que apresentou atividade próxima ao padrão BHT. O ensaio antioxidante ABTS^{•+} demonstrou a elevada capacidade do xanthohumol em inibir esse radical cátion, superior ao controle positivo. As variedades Herkules e Chinook-1 apresentaram as melhores capacidades antioxidantes, evidenciando que o elevado teor de ácidos amargos e xanthohumol refletem na maior efetividade contra o estresse oxidativo. Os extratos com alta concentração de xanthohumol demonstraram elevadas capacidades de captura dos radicais hidroxila e de inibição da enzima xantina oxidase, reduzindo significativamente a formação de ácido úrico. Os resultados com a enzima α -glicosidase revelaram promissora ação farmacológica para todas as amostras, sendo mais eficazes do que o medicamento comercial acarbose, com o padrão xanthohumol apresentando a melhor ação inibitória. Os ensaios de inibição da enzima acetilcolinesterase evidenciaram que os extratos ricos em ácidos amargos foram mais efetivos, obtendo-se valores próximos ao padrão positivo eserina.

Palavras-chave: lúpulo; ácidos amargos; xanthohumol; potencial antioxidante; inibição enzimática.

ABSTRACT

Humulus lupulus Linnaeus (hop) is a plant species rich in phenolic compounds, used in the brewing process, which has a variety of secondary metabolites such as bitter acids, flavonoids, phenolic acids, essential oils, among other substances. Based on the above, this research aims to analyze the antioxidant potential of hops and verify its pharmacological properties to help the treatment of gout, type 2 diabetes and Alzheimer's disease, and the study of quantitation of the major compounds present in its flowers. Varieties of hop flowers planted in Brazil and commercial pellets were obtained and the extracts produced by soxhlet extraction (in hexane and methanol). The quantitation of bitter acids and xanthohumol was performed by high performance liquid chromatography (HPLC). Cultivars Herkules and Chinook-1 showed the highest contents of bitter acids and xanthohumol. The determination of the Total Phenolic Content showed significant results for the Saaz, Chinook-2, Chinook-1 and Herkules varieties. Corroborating with the results obtained from the analysis of the Total Phenolic Content, the Chinook-2 and Saaz varieties presented the best antioxidant activities in the DPPH[•] assay among the methanol extracts, and the Herkules and Chinook-1 varieties among the hexane extracts, confirming the high action of bitter acids, as observed for ICE-4 which showed activity close to the BHT standard. The ABTS^{•+} antioxidant assay demonstrated the high capacity of xanthohumol to inhibit this radical cation, higher to the positive control. The Herkules and Chinook-1 varieties showed the best antioxidant capacities, showing that the high content of bitter acids and xanthohumol reflect in greater effectiveness against oxidative stress. Extracts with a high concentration of xanthohumol demonstrated high capacity to capture hydroxyl radicals and inhibit the enzyme xanthine oxidase, significantly reducing the formation of uric acid. The results with the α -glucosidase enzyme revealed promising pharmacological action for all samples, being more effective than the commercial drug acarbose, with the standard xanthohumol presenting the best inhibitory action. The acetylcholinesterase enzyme inhibition assays showed that extracts rich in bitter acids were more effective, obtaining values close to the positive eserine standard.

Keywords: hop; bitter acids; xanthohumol; antioxidant potential; enzyme inhibition.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Estrutura básica dos α -ácidos ou humulonas	21
Figura 2	– Estrutura química de α -ácidos predominantes em cones e pellets do lúpulo ..	21
Figura 3	– Estrutura básica dos β -ácidos ou lupulonas	22
Figura 4	– Estruturas químicas dos principais β -ácidos ou lupulonas encontrados em cones e pellets de lúpulo	22
Figura 5	– Estrutura química do xanthohumol	23
Figura 6	– Equação de reação química entre o radical DPPH [•] e um composto fenólico genérico	25
Figura 7	– Formação do cátion radical ABTS ^{•+} pela reação com K ₂ S ₂ O ₈ e sua estabilização pela ação de uma substância antioxidante	26
Figura 8	– Reação entre radicais hidroxilas e ácido salicílico formando os ácidos 2,5 e 2,3-dihidroxibenzoico	26
Figura 9	– Fórmula estrutural do padrão mangiferina	28
Figura 10	– Esquema reacional dos ensaios de inibição enzimática e antioxidante frente ao sistema hipoxantina/xantina oxidase	28
Figura 11	– Reação de hidrólise do p-NPG pela enzima α -glicosidase	30
Figura 12	– Estrutura química do medicamento acarbose	31
Figura 13	– Fórmula estrutural do padrão eserina	32
Figura 14	– Processo reacional de conversão da acetiltiocolina no ânion 5-tio-2-nitrobenzoato pela ação da enzima acetilcolinesterase e reação com DTNB .	33
Figura 15	– Esquema reacional do método Folin-Ciocalteu	34
Figura 16	– Fluxograma do processo de obtenção dos extratos por extração exaustiva	37
Figura 17	– Fluxograma do teste de determinação do Teor de Fenólicos Totais	38
Figura 18	– Fluxograma representativo do ensaio antioxidante DPPH [•]	40
Figura 19	– Fluxograma de análise do potencial antioxidante de sequestro do cátion radical ABTS ^{•+}	41
Figura 20	– Configurações do cromatógrafo líquido acoplado a detector de arranjo de diodos para análises frente ao sistema hipoxantina/xantina oxidase	44
Figura 21	– Fluxograma da análise frente ao sistema hipoxantina/xantina oxidase	45
Figura 22	– Fluxograma do ensaio enzimático de inibição da α -glicosidase	47
Figura 23	– Fluxograma do ensaio de inibição da enzima acetilcolinesterase	49

Figura 24	– Processo metodológico da extração QuEChERS e determinação do teor de ácidos amargos e xanthohumol por CLAE-DAD	50
Figura 25	– Configurações do cromatógrafo líquido acoplado a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) utilizado para análise das flores de lúpulo	51
Figura 26	– Cromatogramas dos padrões e extratos do lúpulo: (a) padrão de ácidos amargos ICE-4, (b) padrão xanthohumol, (c) pellet Herkules, (d) pellet Saaz, (e) cones Chinook-1, (f) cones Chinook-2, (g) cones Cascade	53
Figura 27	– Comparação entre os espectros UV de cohumulona padrão e de um extrato de lúpulo analisados nesta pesquisa	59
Figura 28	– Comparação entre os espectros UV de humulona + adhumulona padrão e de um extrato de lúpulo analisados nesta pesquisa	59
Figura 29	– Comparação entre os espectros UV de colupulona padrão e de um extrato de lúpulo analisados nesta pesquisa	60
Figura 30	– Comparação entre os espectros UV de lupulona + adlupulona padrão e de um extrato de lúpulo analisado nesta pesquisa	60
Figura 31	– Comparação entre os espectros UV de xanthohumol padrão e de um extrato de lúpulo analisados nesta pesquisa	61

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 – Cálculo da determinação do percentual de inibição de radical DPPH*	39
Equação 2 – Cálculo da determinação do percentual de inibição do radical ABTS**	41
Equação 3 – Cálculo da determinação do percentual de inibição de DHBA	43
Equação 4 – Cálculo do percentual de inibição da enzima xantina oxidase	44
Equação 5 – Cálculo do percentual de inibição da α -glicosidase	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades farmacológicas dos ácidos amargos	20
Tabela 2 – Propriedades farmacológicas do xanthohumol	20
Tabela 3 – Dados analíticos/estatísticos das curvas padrão e quantificação em g 100g ⁻¹ dos ácidos amargos (α e β) e xanthohumol presentes nas flores, utilizando extração QuEChERS e cromatografia líquida de alta performance (CLAE-DAD)	58
Tabela 4 – Dados analíticos/estatísticos dos teores de fenólicos totais e de análise antioxidante dos extratos e padrões	62
Tabela 5 – Dados analíticos obtidos a partir das análises de inibição enzimática	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABS	Absorbância
ABTS ⁺	2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
AU	Ácido úrico
BHT	<i>Butylated hydroxytoluene</i> - Hidroxitolueno butilado
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> - Albumina sérica bovina
CLAE-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos
CCD	Cromatografia em camada delgada
DA	Doença de Alzheimer
DHBA	<i>Dihydroxybenzoic acid</i> - Ácido dihidroxibenzoico
DM2	Diabetes mellitus do tipo 2
DPPH [•]	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
DTNB	<i>5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)</i> - Ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico)
EAG	Equivalente de ácido gálico
EDTA	<i>Ethylene diamine tetraacetic acid</i> - Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	<i>Enzyme linked immuno sorbent assay</i> - Ensaio de imunoabsorção enzimática
ERN	Espécie reativa de nitrogênio
ERO	Espécie reativa de oxigênio
F-C	Folin-Ciocalteu
HCl	Ácido clorídrico
HPLC-DAD	<i>High performance liquid chromatography coupled to a diode array detector</i>
IBU	<i>International bitterness units</i> - Unidades internacionais de amargor
IC ₅₀	<i>Mean inhibitory concentration</i> - Concentração inibitória média
ICE-4	Extrato de calibração internacional-4
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
<i>p</i> -NP	<i>p-nitrophenol</i> - <i>p</i> -nitrofenol
<i>p</i> -NPG	<i>p-nitrophenyl-α-D-glucopyranoside</i> - <i>p</i> -nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo
QuEChERS	<i>Quick, easy, cheap, effective, rugged and safe</i> - Rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro

rpm	Rotações por minuto
RSD	<i>Relative standard deviation</i> - Desvio padrão relativo
TFT	Teor de fenólicos totais
t _R	Tempo de retenção
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	18
2.1	Objetivo geral	18
2.2	Objetivos específicos	18
3	REFERENCIAL TEÓRICO	19
3.1	Características químicas, relevância econômica e potencial farmacológico do <i>Humulus lupulus</i> Linnaeus	19
3.2	Estresse oxidativo e seus malefícios para o organismo humano: a importância dos antioxidantes naturais	23
3.3	Hiperuricemia e gota: os riscos relacionados ao elevado teor de ácido úrico no organismo humano	26
3.4	Relação entre a enzima α-glicosidase e a doença diabetes mellitus do tipo 2 (DM2): os riscos da hiperglicemia e perspectivas farmacológicas para o seu tratamento	29
3.5	A Doença de Alzheimer: busca por inibidores reversíveis da acetilcolinesterase	31
3.6	Teor de Fenólicos Totais (TFT)	33
4	METODOLOGIA	35
4.1	Lista de Reagentes	35
4.2	Preparo de soluções-tampão	35
4.3	Material vegetal	36
4.4	Obtenção dos extratos em hexano e em metanol via sistema Soxhlet	36
4.5	Teor de Fenólicos Totais – Método de Folin-Ciocalteu	37
4.6	Ensaio antioxidante de combate ao radical DPPH[•]	39
4.7	Ensaio antioxidante de combate ao radical ABTS^{•+}	40
4.8	Ensaio antioxidante de combate ao radical hidroxila e de inibição da enzima xantina oxidase	42
4.9	Ensaio de inibição da enzima α-glicosidase	45
4.10	Ensaio de inibição da enzima acetilcolinesterase	47
4.11	Quantificação química de ácidos amargos e xanthohumol utilizando extração QuEChERS e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE –	49

	DAD)	
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1	Análise qualitativa e quantitativa dos constituintes químicos utilizando cromatografia líquida de alta performance (CLAE – DAD)	52
5.2	Teor de Fenólicos Totais (TFT) e ensaios antioxidantes (DPPH [•] e ABTS ^{•+}) ..	61
5.3	Análises de captura do radical hidroxila e inibição das enzimas xantina oxidase, α -glicosidase e acetilcolinesterase	65
6	CONCLUSÃO	70
	REFERÊNCIAS	71

1 INTRODUÇÃO

As espécies vegetais apresentam em suas composições uma ampla diversidade de constituintes químicos que apresentam propriedades de combater o estresse oxidativo e de atuar como inibidores enzimáticos auxiliando no tratamento de enfermidades (NASCIMENTO, 2022). Um exemplo de espécie vegetal atualmente estudada é o lúpulo (*Humulus lupulus* Linnaeus). Suas flores apresentam uma diversidade de metabólitos secundários em sua composição, tais como: ácidos amargos (α - humulonas e β - lupulonas), flavonoides (xanthohumol), estilbenos, ácidos fenólicos e óleos essenciais, que conforme aponta a literatura, possuem significativa ação medicinal (BAMFORTH, 2003; BAXTER; HUGHES, 2001; RETTBERG; BIENDL; GARBE, 2018; DURELLO; SILVA; BOGUSZ JUNIOR, 2019; MARQUES et al., 2022; ABIKO; PAUDEL; UEHARA, 2022).

Grande parte dos estudos acerca da capacidade antioxidante em espécies vegetais e compostos puros, utilizam procedimentos de inibição/inativação com os radicais DPPH^{*} (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) e ABTS⁺ (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácidosulfônico) (MARQUES et al., 2015; SRIDHAR; CHARLES, 2019; RUMPF; BURGER; SCHULZE, 2023). Apesar desses dois métodos serem amplamente relatados na literatura, o estudo da capacidade antioxidante frente ao radical hidroxila (^{*}OH) é um importante método de análise, tendo em vista ser o radical mais deletério ao organismo humano devido a sua curta meia-vida e dificuldade de sequestro *in vivo* (BARREIROS; DAVID, 2006; MARQUES et al., 2015).

Além de pesquisas referentes as atividades antioxidantes de espécies vegetais, outra análise importante em relação as propriedades farmacológicas é o estudo de inibição enzimática (NASCIMENTO, 2022). Neste trabalho foram realizados estudos com três enzimas: xantina oxidase, α -glicosidase e acetilcolinesterase. Essas enzimas estão diretamente relacionadas à gota, ao diabetes do tipo 2 e à doença de Alzheimer respectivamente (TREVISAN; MACEDO, 2003; AZEVEDO et al., 2017; TSUNODA et al., 2022).

A enzima xantina oxidase é a organela responsável pela síntese de ácido úrico no organismo humano, sendo este um processo metabólico natural, no qual o corpo realiza essa produção a partir de diversos compostos bioquímicos presentes no organismo humano como os aminoácidos, os ácidos nucleicos e as bases nitrogenadas do grupo purinas como adenina, guanina e a xantina (CUI et al., 2022). O elevado teor de ácido úrico na corrente sanguínea, condição esta denominada de hiperuricemia, provoca complicações para o organismo humano e está associada a outras doenças como gota, hipertensão, cálculos renais, aterosclerose e diabetes (RODDY; CHOI, 2014; AZEVEDO et al., 2017; BORGHI; BENTIVENGA;

COSENTINO, 2020; CUI et al., 2022). Diferentes trabalhos também relatam uma relação estreita entre o alto nível de ácido úrico e a incidência de infarto do miocárdio (BORGHI; BENTIVENGA; COSENTINO, 2020).

Já a enzima α -glicosidase está relacionada diretamente com o teor de glicose presente na corrente sanguínea, sendo responsável pela contribuição na digestão de carboidratos oriundos da dieta alimentar (NELSON; COX, 2014; NASCIMENTO, 2022). Para permitir a digestão de carboidratos pelo organismo humano, a enzima α -glicosidase age hidrolisando os açúcares como oligossacarídeos e dissacarídeos em glicose através da quebra das ligações glicosídicas, permitindo a absorção desses nutrientes pelo intestino delgado (ABBAS; AL-HARRASI; HUSSAIN, 2017; NASCIMENTO, 2022). Logo, possibilita o aumento de glicose pós-prandial na corrente sanguínea.

Condições elevadas e de descontrole do índice glicêmico podem favorecer o surgimento/agravamento da doença diabetes mellitus do tipo 2 (DM2) e diversos problemas associados para o organismo humano como resistência à insulina, aumento do risco de doenças cardiovasculares, intolerância a glicose, hipertrigliceridemia e hipertensão arterial (MCLELLAN et al., 2007; GARG; DUGGAL, 2022; WANG et al., 2022; MUSHTAQ et al., 2023).

Tendo em vista as complicações relacionadas ao elevado teor de ácido úrico e de glicose na corrente sanguínea, os riscos de desenvolvimento de doenças associadas a hiperuricemia e ao diabetes, os efeitos colaterais de medicamentos como o alopurinol e a acarbose, torna-se essencial pesquisas com o objetivo de descoberta de compostos bioativos com ação inibitória das enzimas xantina oxidase e α -glicosidase, que é apontada como uma importante abordagem terapêutica para tratamento da hiperuricemia e do elevado índice glicêmico em portadores de DM2 (AZEVEDO et al., 2017; TSUNODA et al., 2022).

A patologia neurodegenerativa do Alzheimer atinge principalmente a população idosa e atualmente acomete, em algum estágio, cerca de 4,02% dos indivíduos com idade acima de 60 anos, afetando cerca de 4,6 milhões de pessoas por ano (FERRI et al., 2005; BURNS; ILIFFE, 2009; TAQUI et al., 2022). Atualmente, um promissor meio para o tratamento desta doença é aumentar os níveis de acetilcolina entre as sinapses neuronais, utilizando substâncias que atuem como inibidores da enzima acetilcolinesterase (TREVISAN; MACEDO, 2003).

Considerando validar a possível ação farmacológica frente as enfermidades supracitadas, e as propriedades investigadas para os constituintes químicos majoritários das flores de lúpulo (ácidos amargos e xanthohumol), este trabalho avaliou a capacidade

farmacológica de extratos das flores de diferentes cultivares de lúpulo e de padrões analíticos. Os extratos foram obtidos por extração Soxhlet de pellets comerciais importados e cones produzidos no Brasil e as amostras foram testadas frente a diferentes sistemas antioxidantes (DPPH[•], ABTS^{•+} e [•]OH) e de inibição enzimática (xantina oxidase, α -glicosidase e acetilcolinesterase). Adicionalmente, foram avaliados os teores de ácidos amargos e xanthohumol das amostras estudadas utilizando cromatografia líquida no intuito de identificar correlações entre os dados quantitativos com os resultados das ações farmacológicas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudo químico da espécie *Humulus lupulus* Linnaeus através da análise de propriedades antioxidantes e farmacológicas como atividades inibitórias de enzimas relacionadas a gota, diabetes mellitus do tipo 2 e doença de Alzheimer, e a identificação e quantificação dos compostos majoritários presentes em flores e pellets.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar e quantificar os compostos majoritários presentes em pellets comerciais e flores (cones) de lúpulo por extração QuEChERS.
- Obter extratos em hexano e em metanol de diferentes variedades de lúpulo.
- Analisar o Teor de Fenólicos Totais nos extratos em metanol de pellets comerciais e cones de lúpulo.
- Determinar a capacidade antioxidante dos extratos em hexano e em metanol do lúpulo e de padrões analíticos.
- Avaliar a inibição da enzima xantina oxidase por extratos em hexano e em metanol do lúpulo e por padrões analíticos.
- Verificar a inibição da enzima α -glicosidase por extratos em hexano e em metanol do lúpulo e por padrões analíticos.
- Analisar o potencial inibitório da enzima acetilcolinesterase por extratos em hexano e em metanol do lúpulo e por padrões analíticos.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Características químicas, relevância econômica e potencial farmacológico do *Humulus lupulus* Linnaeus

O lúpulo, denominado de *Humulus lupulus* Linnaeus, é uma planta proveniente da região da Ásia, e com cultivo elevado nas regiões da América do Norte e Europa, o qual pertence a ordem das Rosales e família Cannabaceae (HIERONYMUS, 2012; DURELLO; SILVA; BOGUSZ JUNIOR, 2019; ABIKO; PAUDEL; UEHARA, 2022).

Apesar da diversidade de compostos químicos presentes na constituição química do lúpulo, sua principal aplicação é no mercado de cervejaria, sendo 97% da sua produção destinada a esse setor (DURELLO; SILVA; BOGUSZ JUNIOR, 2019). Sua importância está relacionada as glândulas de lupulina, que excretam grãos amarelados denominados de lupulina, onde estão presentes os seus principais metabólitos secundários como os polifenóis, os ácidos amargos e os óleos essenciais, encontrados principalmente nas espécies vegetais fêmeas do lúpulo (TING; RYDER, 2017; WANNENMACHER; GASTL; BECKER, 2018; DURELLO; SILVA; BOGUSZ JUNIOR, 2019). Essas substâncias conferem a cerveja ações antimicrobiana e antioxidante concedendo-a proteção aos processos oxidativos e a ação de microrganismos caso ocorra alguma contaminação, além de conferir amargor, sabor, aroma e flavor ao produto (BAMFORTH, 2003; BAXTER; HUGHES, 2001; SCHONBERGER et al., 2011; RETTBERG; BIENDL; GARBE, 2018; DURELLO; SILVA; BOGUSZ JUNIOR, 2019).

Dentre os metabólitos secundários presentes na constituição do lúpulo, os ácidos amargos e xanthohumol são as espécies predominantes presentes nas flores dessa planta, e apresentam, conforme aponta a literatura, ações farmacológicas conforme apresentam as tabelas 1 e 2:

Tabela 1 – Propriedades farmacológicas dos ácidos amargos.

Aplicações farmacológicas	Referências
Atividades anticâncer, antioxidante, anti-inflamatória, de inibição de peroxidação lipídica, antihiperlipidêmica e contribuição no metabolismo dos lipídeos	VAN CLEEMPUT et al., 2009; DURELLO; SILVA; BOGUSZ JUNIOR, 2019; LIN et al., 2019; ABIKO; PAUDEL; UEHARA, 2022; WANG et al., 2022.

Fonte: Autor (2023).

Tabela 2 – Propriedades farmacológicas do xanthohumol.

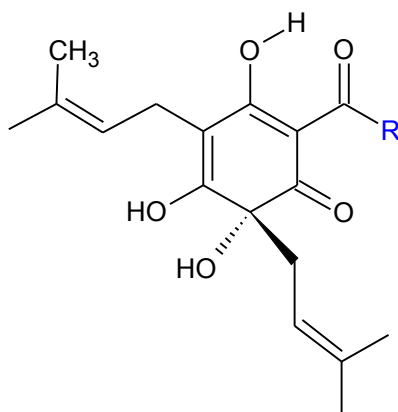
Aplicações farmacológicas	Referências
Atividades anticâncer, antibacteriana, antioxidante, antiobesidade, antiviral, anti-inflamatória, antihiperlipidêmica e antiplaquetária	STEVENS; PAGE, 2004; CERMAK et al. 2017; LUZAK et al., 2016; BOLTON et al., 2019; LIU et al., 2019; ABIKO; PAUDEL; UEHARA, 2022; MARQUES et al., 2022; WANG et al., 2022.

Fonte: Autor (2023).

Os ácidos amargos são metabólitos secundários presentes nas resinas totais do lúpulo, especificamente nas resinas macias. Essas substâncias podem ser isoladas através de procedimentos de análise de solubilização em diferentes solventes. As resinas macias são obtidas através da adição de hexano as resinas totais, pois são solúveis nesse solvente. Após a obtenção das resinas macias e realizando-se a adição de solução de acetato de chumbo, observa-se a formação de precipitado, denominado de α -ácidos, e o sobrenadante, denominado de fração beta das resinas macias, é onde encontram-se os β -ácidos (DURELLO; SILVA; BOGUSZ JUNIOR, 2019; ALMAGUER et al., 2014).

Os ácidos amargos apresentam em sua constituição química a função orgânica enol, que apresenta maior facilidade de desprotonação formando um ânion enolato, devido ao efeito mesomérico estabilizante. Essa estabilização reflete em um valor de pKa entre 4,0 – 5,5, apresentando caráter ácido (DURELLO; SILVA; BOGUSZ JUNIOR, 2019). Existem dois grupos dos ácidos amargos, humulonas e lupulonas, que podem apresentar modificação em sua estrutura gerando outros compostos da classe dos ácidos amargos já relatados na literatura. A estrutura básica das humulonas é apresentada pela figura 1:

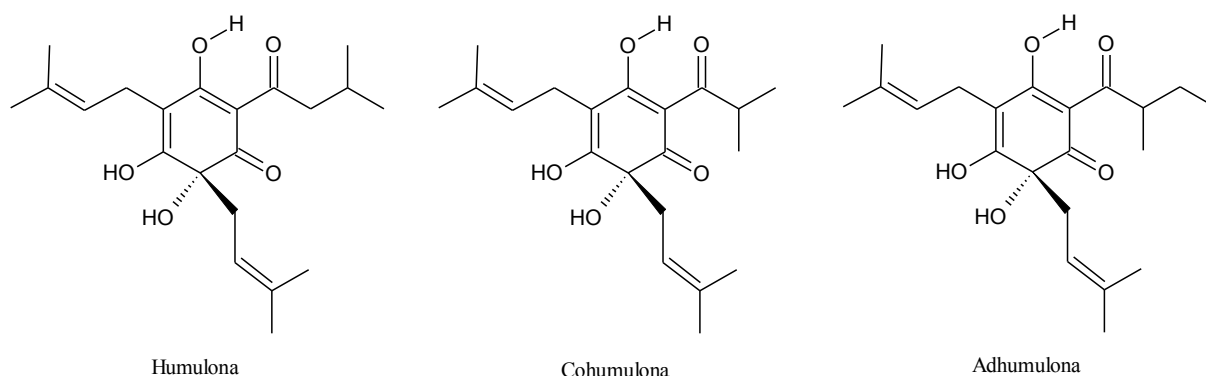
Figura 1 – Estrutura básica dos α -ácidos ou humulonas.



Fonte: Autor (2023).

Dependendo do grupo “R” ligado a carbonila da estrutura do ácido amargo, esse recebe uma nomenclatura diferente, podendo ser um grupo isobutil ou isopropil dentre outros. A figura 2 apresenta os α -ácidos encontrados nas flores do lúpulo em maiores concentrações:

Figura 2 – Estrutura química de α -ácidos predominantes em cones e pellets do lúpulo.

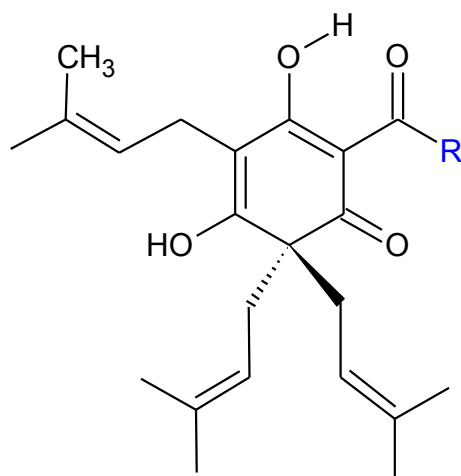


Fonte: Autor (2023).

As estruturas químicas apresentadas nas imagens recebem denominação de α_1 – referente a cohumulona, e α_2 – referente a humulona e adhumulona. O último se refere a dois compostos devido a presença de coeluição nos métodos de análise de lúpulo já relatados por Marques et al. (2022).

As lupulonas diferenciam-se das humulonas devido a substituição de um grupo hidroxila de sua estrutura por um grupo prenil, conforme apresenta a figura 3:

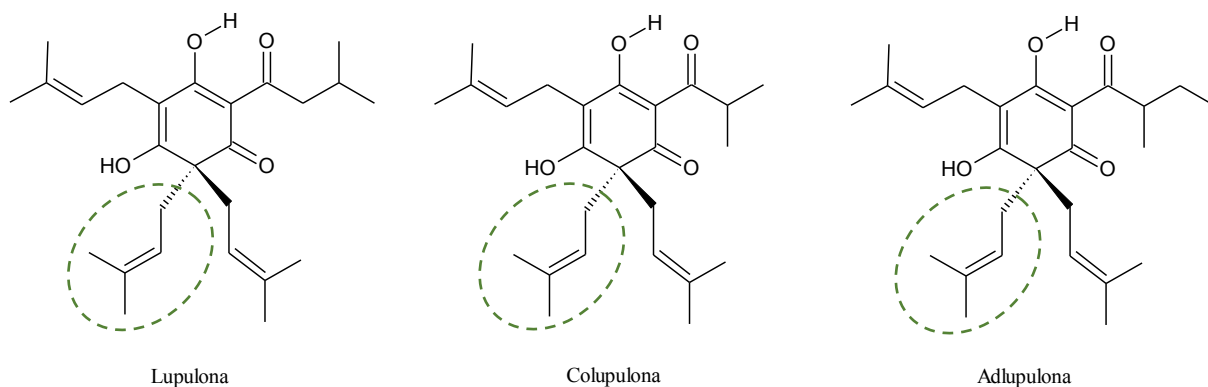
Figura 3 – Estrutura básica dos β -ácidos ou lupulonas.



Fonte: Autor (2023).

Da mesma forma que as humulonas, as lupulonas também apresentam diferentes grupos alquila ligados a carbonila adjacente ao ciclo de 6 membros, conforme apresenta a figura 4:

Figura 4 – Estruturas químicas dos principais β -ácidos ou lupulonas encontrados em cones e pellets de lúpulo.



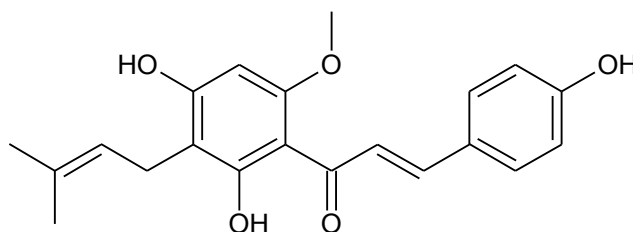
Fonte: Autor (2023).

A presença de um grupo prenil adicional, destacado em verde, na fórmula estrutural das lupulonas conferem a essas uma maior apolaridade em relação as humulonas, o que implica em um maior tempo de retenção em análises envolvendo cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com coluna de fase reversa, como uma C-18. É possível observar também que tanto em relação aos α -ácidos quanto para os β -ácidos, as humulonas e adhumulonas assim como as lupulona e adlupulona apresentam a mesma fórmula molecular. Isso resulta no surgimento de um único pico referente às humulonas e adhumulonas, α_2 , e as

lupulonas e adlupulonas, β_2 , em uma análise cromatográfica conforme relatado por Marques et al. (2022).

O xanthohumol, o principal componente polifenólico observado no lúpulo, é um flavonoide de cadeia aberta denominado de chalcona. As chalconas são metabólitos que apresentam atividades farmacológicas como potencial anti-inflamatório, antioxidante, anticonvulsivante e antinociceptiva (MOHAMAD et al., 2010; ÖZDEMIR et al., 2015; NASSAR et al., 2016; VANANGAMUDI; SUBRAMANIAN; THIRUNARAYANAN, 2017; FERREIRA et al., 2018). A estrutura química do xanthohumol é apresentada pela figura 5:

Figura 5 – Estrutura química do xanthohumol.



Fonte: Autor (2023).

Apesar da predominância do xanthohumol na composição química das variedades das flores de lúpulo, nesta planta também podem ser observados uma ampla variedade de polifenóis (BOCQUET et al., 2018; KESKIN et al., 2019).

3.2 Estresse oxidativo e seus malefícios para o organismo humano: a importância dos antioxidantes naturais

Os radicais livres são formados como subproduto de processos metabólicos endógenos do organismo humano, como ocorre durante o processo de respiração celular nas mitocôndrias (KUMAR et al., 2023). São espécies que apresentam instabilidade derivada do desemparelhamento de elétrons, o que explica sua alta reatividade. No que se refere ao organismo humano, os principais radicais apresentam oxigênio e nitrogênio em sua composição, sendo denominados de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) (NASCIMENTO et al., 2022). São exemplos de ERO o peróxido de hidrogênio, radical hidroxila, ânion superóxido, radical hidroperoxila, e de ERN as espécies óxido de nitrito, os ânions peroxinitritos dentre outras (NASCIMENTO, 2019; KUMAR et al., 2023).

É importante para o organismo humano a manutenção de índices equilibrados de

radicais livres e antioxidantes. O descontrole entre os níveis de ERO e ERN gerados e sua neutralização por sistemas endógenos causa o fenômeno denominado de estresse oxidativo (KUMAR et al., 2023). Sistemas enzimáticos presentes no organismo como superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidase ajudam a regular o teor de ERO no corpo humano, visando minimizar os efeitos causados por essas espécies químicas (KUMAR et al., 2023). As duas últimas são responsáveis pela decomposição de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, ação importante devido a possibilidade de reação do peróxido de hidrogênio com íons metálicos Cu^+ e Fe^{+2} , gerando no organismo radicais hidroxila, a ERO com maior potencial deletério ao organismo humano (KUMAR et al., 2023; COLLIN, 2019; BARREIROS; DAVID, 2006).

O elevado potencial reativo dos radicais livres acarreta complicações relacionadas também ao material genético como mutações de ácidos nucleicos, ocasionando o rompimento das cadeias de DNA (KUMAR et al., 2023; WU; CEDERBAUM, 2003). Pesquisas também apontam a degradação de lipídeos pela ação de radicais livres de oxigênio podendo ocasionar morte de células, devido a interação com fosfolipídios que compõem as suas membranas (COLLINS et al 2012; LEE; KOO; MIN, 2004; SEIFRIED et al., 2007). As ERO apresentam também a capacidade de oxidar aminoácidos, componente básico das proteínas, podendo modificar sua estrutura quaternária e provocar possível perda de sua função enzimática (COLLINS et al 2012; LEE; KOO; MIN, 2004; SEIFRIED et al., 2007).

A ação das ERO e ERN no corpo humano e os malefícios causados por essa interação evidencia a importância da ingestão na dieta diária de vegetais, frutas ou chás com elevado teor de compostos fenólicos que apresentam ação antioxidante relatada na literatura (NASCIMENTO, 2019).

Os compostos fenólicos englobam classes de compostos que apresentam o grupo funcional hidroxila ligado a um anel aromático como os flavonoides e os ácidos fenólicos dentre outros, que são amplamente observados em espécies vegetais (TIVERON, 2010). Essa subdivisão dos compostos fenólicos é realizada tendo como base a estrutura química das substâncias, que apresenta um esqueleto específico comum a cada classe. Por exemplo, compostos químicos presentes as classes dos fenóis simples, ácidos fenólicos, estilbenos e flavonoides apresentam as estruturas básicas C_6 , $\text{C}_6\text{-C}_1$, $\text{C}_6\text{-C}_2\text{-C}_6$ e $\text{C}_6\text{-C}_3\text{-C}_6$ respectivamente (TIVERON, 2010).

Esses metabólitos apresentam ação antioxidante já relatada na literatura, que pode ser explicada devido a presença de grupos hidroxila conjugados com anéis aromáticos presentes em suas estruturas químicas. Logo, a perda de um radical hidrogênio gerando um

radical oxigenado, fenoxila, é estabilizado pelo efeito mesomérico, diminuindo o potencial oxidativo da ERO (CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007).

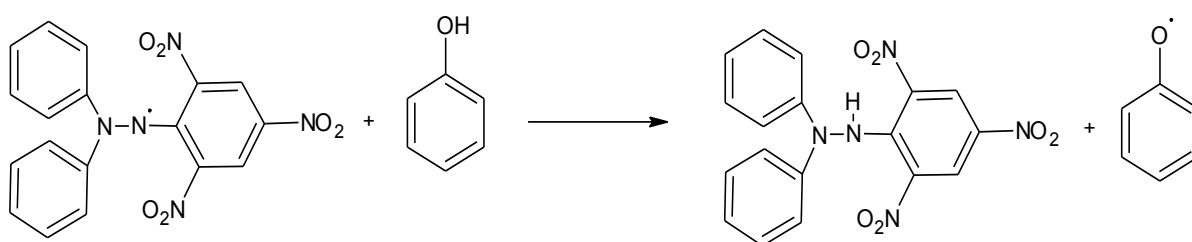
O lúpulo apresenta uma diversidade de compostos fenólicos em sua constituição química, que conforme aponta a literatura, são antioxidantes naturais (DURELLO; SILVA; BOGUSZ JUNIOR, 2019). Diversos compostos fenólicos já foram relatados em espécies do lúpulo como: flavonoides (kaempferol e quercetina), flavan-3-óis (catequina e epicatequina), estilbenos (trans-resveratrol) e ácidos fenólicos (ácidos gálico, ferúlico e cafeico) dentre outros compostos (BOCQUET et al., 2018; ALMARGUER et al, 2014).

As propriedades antioxidantes são alvo de estudos em diversos trabalhos sobre química de produtos naturais, devido a malefícios causados pela ação de ERO e ERN no organismo humano. Análises de sequestro de radicais como DPPH[•] e ABTS^{•+}, são amplamente discutidos com o intuito de determinar a atividade antioxidante de extratos vegetais e padrões (MARQUES et al., 2015; SRIDHAR; CHARLES, 2019; RUMPF; BURGER; SCHULZE, 2023). Porém, outros métodos de análise antioxidante são relatados em artigos científicos como as análises FRAP, ORAC e radicais hidroxila (MARQUES et al., 2015).

Os radicais hidroxila, objetivo de estudo neste trabalho, apresentam forte potencial de redução, tornando-se altamente deletério para o organismo humano devido a sua reatividade, o que acarreta em sua baixa meia-vida, sendo difícil sua captura no organismo humano (BARREIROS; DAVID, 2006).

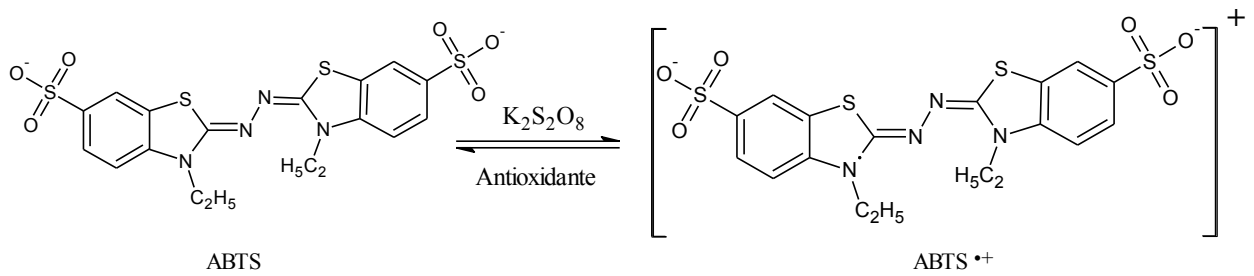
As figuras 6, 7 e 8 ilustram os processos reacionais envolvidos nos procedimentos de análise antioxidante nos métodos DPPH[•], ABTS^{•+} e radicais hidroxila:

Figura 6 – Equação de reação química entre o radical DPPH[•] e um composto fenólico genérico.



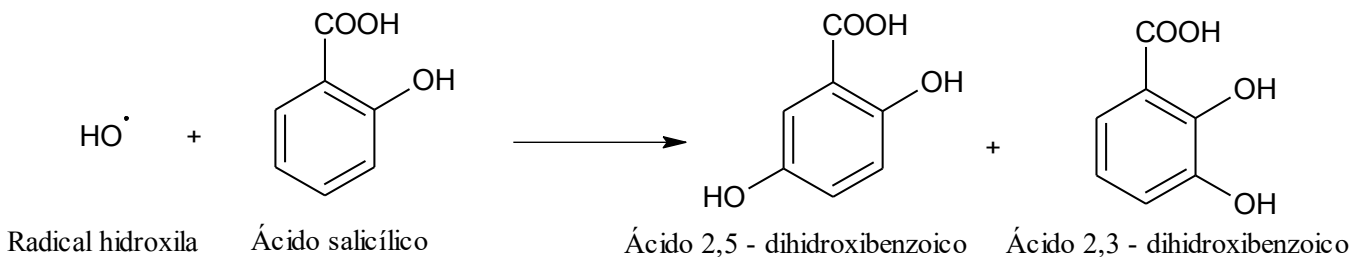
Fonte: Autor (2023).

Figura 7 – Formação do cátion radical ABTS^{•+} pela reação com K₂S₂O₈ e sua estabilização pela ação de uma substância antioxidante.



Fonte: Autor (2023).

Figura 8 – Reação entre radicais hidroxilas e ácido salicílico formando os ácidos 2,5 e 2,3-dihidroxibenzoico.



Fonte: Autor (2023).

3.3 Hiperuricemia e gota: os riscos relacionados ao elevado teor de ácido úrico no organismo humano

O processo de formação de ácido úrico no organismo humano é desempenhado pela enzima xantina oxidase (CUI et al., 2022). O índice de purinas presentes no organismo apresenta relação com a dieta alimentar, tornando-se alto quando a alimentação é baseada em alimentos muito calóricos e com elevado teor de proteínas e purinas (KUBOTA, 2019). O número de pacientes diagnosticados com hiperuricemia é crescente, e se tornou a segunda maior doença metabólica que atinge a população mundial, perdendo apenas para o diabetes (ZHU; PANDYA; CHOI, 2011; YANG et al, 2023).

Distúrbios relacionados a síntese de ácido úrico assim como a má alimentação podem ocasionar o aumento do percentual desse composto na corrente sanguínea, condição denominada de hiperuricemia. O valor de concentração normal de ácido úrico na corrente sanguínea é de 6,0 mg dL⁻¹ e o quadro de hiperuricemia é de 6,8 mg dL⁻¹, valor que representa o limite de solubilidade de sais de urato (BARDIN; RICLETTE, 2014; AZEVEDO et a.,

2017). O excesso de ácido úrico excedente no organismo gera malefícios para o organismo humano devido a possibilidade deste composto de provocar reações oxidantes e pró-inflamatórias, o que explica os fenômenos inflamatórios em pacientes com elevado teor de ácido úrico sérico (SAUTIN; JOHNSON, 2008).

O excesso de ácido úrico no sangue está relacionado ao processo de deposição de cristais de urato monossódico nas articulações e tecidos, provocando o surgimento ou agravamento de gota, mas esse acúmulo também pode ocorrer nas regiões dos joelhos e tornozelos desenvolvendo casos de artrite (PEREZ-RUIZ, 2014; AZEVEDO et al. 2017).

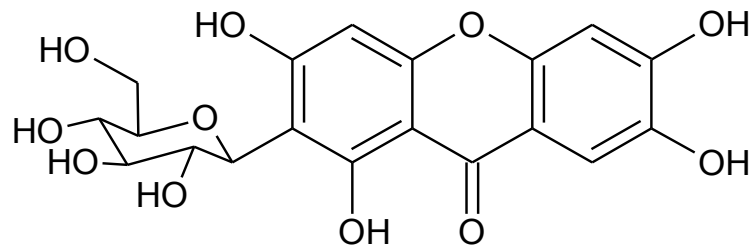
Esse processo de geração de cristais no organismo humano desencadeia e agrava o surgimento de outras enfermidades como gota, hipertensão, aterosclerose, processos inflamatórios, doenças cardiovasculares, danos aos rins e possibilidade de formação de cálculos renais (SAUTIN; JOHNSON, 2008; AZEVEDO et al., 2017; RODDY; CHOI, 2014; BORGUI et al., 2022; CUI et al., 2022).

O agravamento ou comprometimento dos rins derivado do elevado teor de ácido úrico no corpo humano (superior a 6 mg/dL) ocorre devido ao aumento da função renal. O excesso de ácido úrico é excretado pelos rins, o que a longo prazo acaba sobrecarregando-o e comprometendo-o propiciando o surgimento de problemas renais (ZHANG, 2006; LIPKOWITZ, 2012).

Com o objetivo de combate ao agravamento da hiperuricemia e gota, fármacos reguladores da enzima xantina oxidase foram sintetizados, baseando-se no modelo de inibição enzimática (STOCKER et al, 2012; AZEVEDO et al., 2017). Esse processo retarda a síntese de ácido úrico, minimizando os efeitos da hiperuricemia. O mecanismo de inibição enzimática é a forma como os principais fármacos de combate a gota agem no organismo humano, como o alopurinol e o febuxostate (AZEVEDO et al., 2017).

Os dados da literatura informam que compostos polifenóis apresentam significativa ação de inibição dessa enzima (NILE et al., 2016; YAO et al., 2022; YANG et al., 2023). O mesmo procedimento foi realizado nesta pesquisa para análise de inibição da formação de ácido úrico, a partir da ação da enzima xantina oxidase na oxidação de hipoxantina. Como controle positivo foi utilizado o padrão mangiferina, que tem sua fórmula estrutural apresentada pela figura 9:

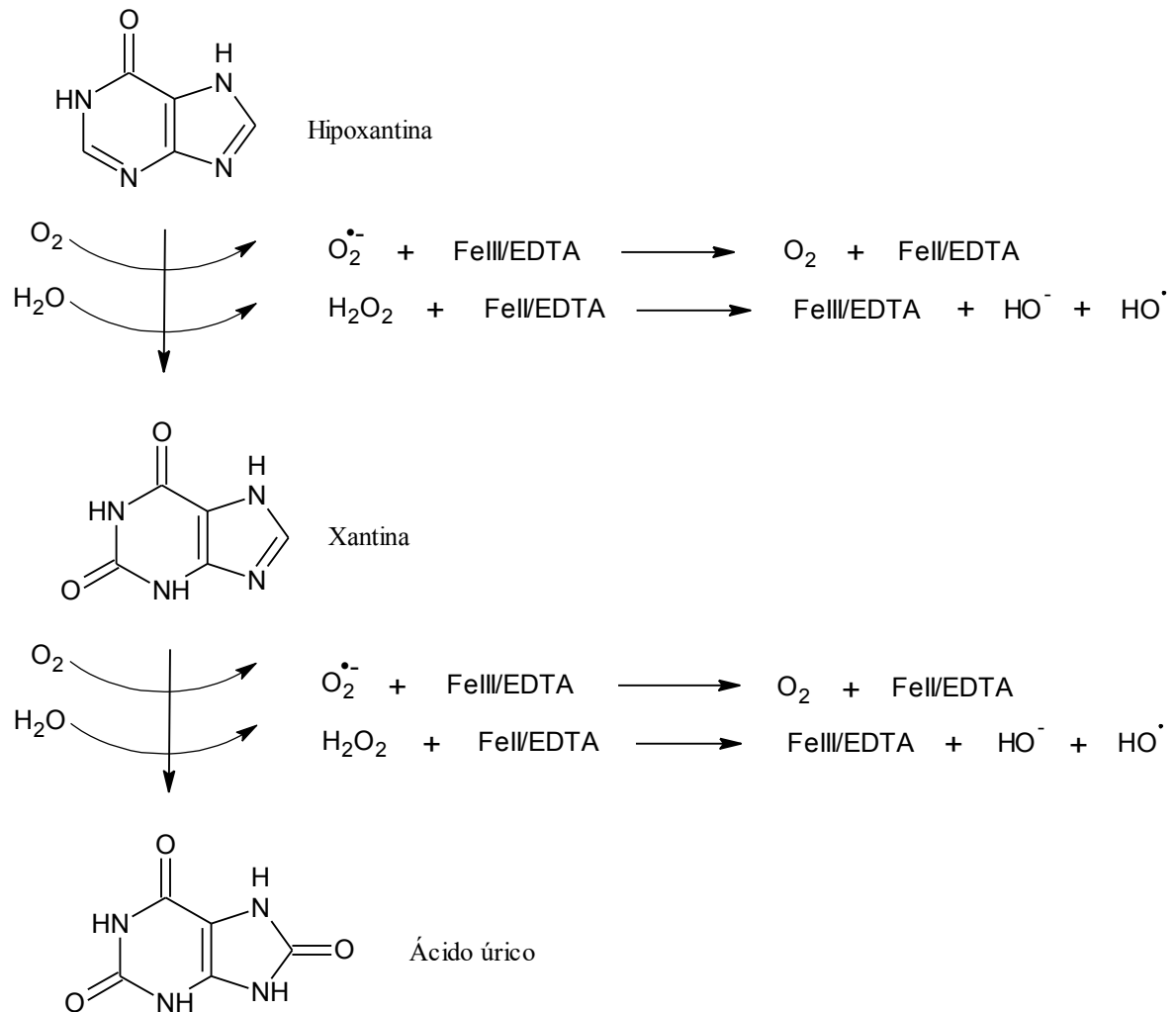
Figura 9 – Fórmula estrutural do padrão mangiferina.



Fonte: Autor (2023).

O sistema de análise antioxidante e de inibição da enzima xantina oxidase utilizado nesta pesquisa é apresentado pela figura 10:

Figura 10 – Esquema reacional dos ensaios de inibição enzimática e antioxidante frente ao sistema hipoxantina/xantina oxidase.



Fonte: Autor (2023).

É possível observar a formação de radicais superóxido e peróxido de hidrogênio derivado do processo de oxidação da hipoxantina e xantina a ácido úrico em meio contendo água e gás oxigênio. O radical superóxido sofre oxidação pela ação do complexo FeIII/EDTA, liberando gás oxigênio e o complexo reduzido FeII/EDTA. Em seguida o complexo reduzido reage com peróxido de hidrogênio restituindo a estrutura inicial do complexo FeIII/EDTA, agindo como catalisador, e ocorre liberação de radicais hidroxila para o meio reacional. Os radicais hidroxila gerados no processo oxidativo interage com o ácido salicílico presente no sistema formando os ácidos 2,5 e 2,3-dihidroxibenzoico (MARQUES, 2017).

Por tanto, pode-se concluir que o ensaio envolve dois processos químicos: inibição da enzima xantina oxidase e captura dos radicais hidroxila. A inibição da enzima pode ser determinada analisando-se a capacidade de um extrato ou padrão em inibir a formação de ácido úrico. A capacidade antioxidante neste método está relacionada com a competição com o ácido salicílico pelos radicais hidroxila, visando a inibição de formação dos ácidos 2,5 e 2,3-dihidroxibenzoico (MARQUES, 2017).

3.4 Relação entre a enzima α -glicosidase e a doença diabetes mellitus do tipo 2 (DM2): os riscos da hiperglicemia e perspectivas farmacológicas para o seu tratamento

Açúcares, gorduras e proteínas são as três fontes de energia oriunda da alimentação. São essenciais para o pleno desenvolvimento do organismo humano, e sua metabolização ocorre pela ação de enzimas específicas (NELSON; COX, 2014).

Os açúcares, polissacarídeos ou hidratos de carbonos são a fonte primária de energia, sendo obtida na forma de biomoléculas a partir dos alimentos sob a forma de açúcar ou amido (NELSON; COX, 2014). Devido à complexidade de metabolização de macromoléculas, as enzimas α -glicosidases são essenciais para a absorção dos nutrientes. Essas enzimas são responsáveis pela realização de reação de hidrólise dos polissacarídeos, formando mono e dissacarídeos que são absorvidos pelo intestino (ABBAS; AL-HARRASI; HUSSAIN, 2017; NASCIMENTO, 2022). Porém, a elevada ingestão de açúcares acarreta um aumento do índice de glicose pós-prandial na corrente sanguínea, condição essa denominada de hiperglicemia (NASCIMENTO, 2022).

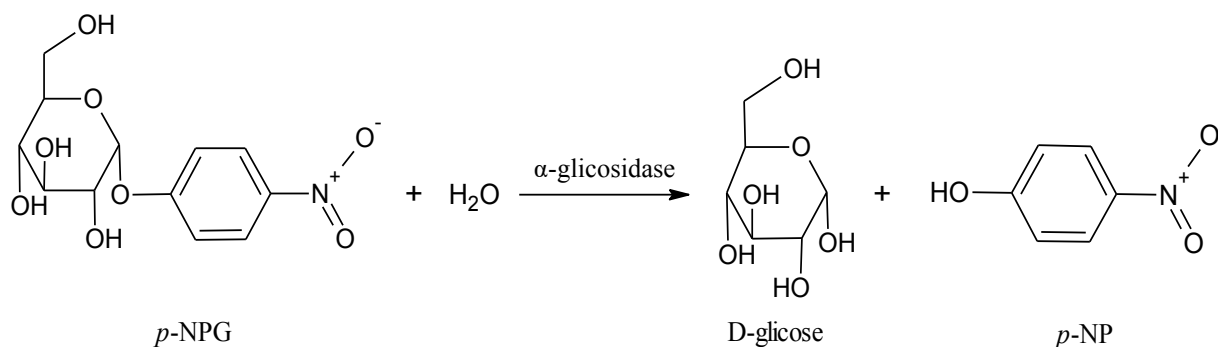
As principais formas de diabetes mellitus são do tipo 1 e 2, sendo a primeira uma doença autoimune derivada da destruição de células β do pâncreas impedindo a formação de insulina, necessária para controle do índice hiperglicêmico e da cetoacidose diabética (GROSS et al, 2002; NASCIMENTO, 2022). Já a diabetes do tipo 2 (DM2), observada em

90% dos casos de diabetes, não apresenta resposta autoimune do organismo (GROSS et al., 2002).

O quadro clínico de um paciente diagnosticado com diabetes pode desencadear o surgimento ou agravar outros distúrbios associados como aumento de riscos de doenças cardiovasculares, aterosclerose, obesidade, doenças hepáticas relacionadas a índices de gordura e processos inflamatórios devido ao estresse oxidativo derivado da hiperglicemia (GROSS et al., 2002; NASCIMENTO, 2022; AL-ISHAQ et al., 2019).

O estudo reacional de inibição da reação de hidrólise de carboidratos pela ação da enzima α -glicosidase utilizada nesta pesquisa é apresentada pela figura 11:

Figura 11 – Reação de hidrólise do *p*-NPG pela enzima α -glicosidase.



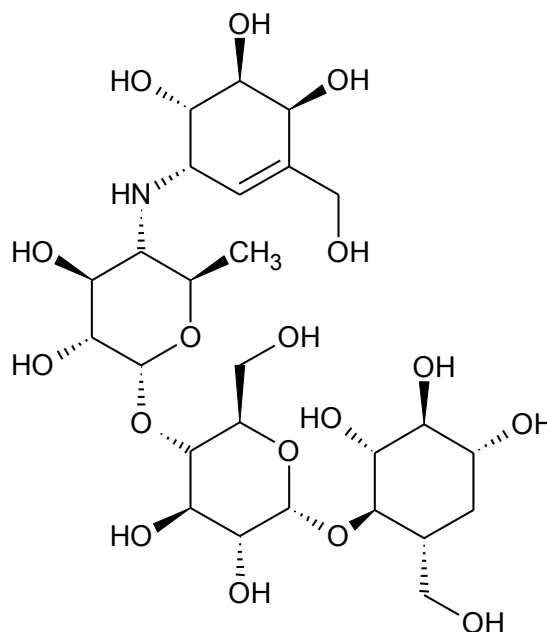
Fonte: Autor (2023).

O reagente *p*-NPG (*p*-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo) é utilizado como substrato inicial da reação que é hidrolisado pela enzima α -glicosidase. Essa reação proporciona a quebra e liberação para o meio reacional de uma molécula de glicose e formação do *p*-NP (*p*-nitrophenol - *p*-nitrofenol) que apresenta coloração amarelada.

Objetivando diminuir o índice de açúcar na corrente sanguínea pós-prandial, pesquisas apontam que o estudo de moléculas ou extratos capazes de inibir a enzima α -glicosidase seja um mecanismo promissor (FENG et al., 2022). Esta ação tem como princípio a diminuição da velocidade de absorção dessas moléculas, visando diminuir o impacto causado em pacientes portadores de diabetes do tipo 2.

Como controle positivo de inibição enzimática foi utilizado o medicamento acarbose, que apresenta como mecanismo de ação no organismo humano a inibição da enzima α -glicosidase (TSUNODA et al., 2022). A figura 12 a apresenta a estrutura química da acarbose:

Figura 12 – Estrutura química do medicamento acarbose.



Fonte: Autor (2023).

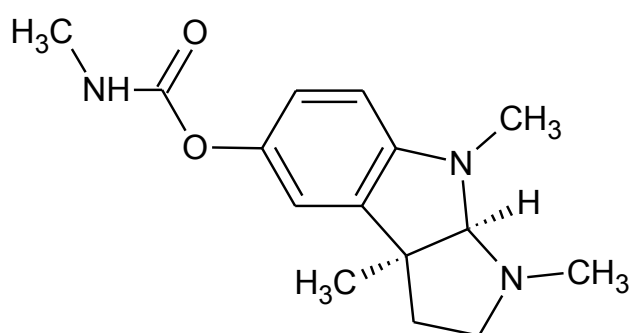
3.5 A Doença de Alzheimer: busca por inibidores reversíveis da acetilcolinesterase

Estudos recentes apontam que a doença de Alzheimer (DA) atinge cerca de 60% de toda a população idosa acima de 60-65 anos (SHARMA; SINGH, 2023). A condição clínica de demência já atingiu mais de 50 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo 60-70% desses casos relacionados a DA. Referências indicam que o número de pacientes portadores de DA em algum estágio possa dobrar a cada 20 anos até 2050 (COELHO et al., 2018; SCHELTENS et al., 2016).

A condição bioquímica observada na doença de Alzheimer está relacionada aos baixos índices de neurotransmissores, como a acetilcolina, nas terminações nervosas, prejudicando a transmissão de informações entre os neurônios, tornando evidente o aparecimento dos primeiros sinais de déficit cognitivo (TREVISAN; MACEDO, 2003). Como alternativa para viabilizar e beneficiar a função colinérgica do cérebro, pesquisas apontam que a elevação dos níveis de acetilcolina pode frear os danos observados no processo cognitivo dos portadores da doença (TREVISAN; MACEDO, 2003). Partindo deste princípio, inibidores reversíveis da acetilcolinesterase são essenciais para a manutenção do índice de neurotransmissores, mecanismo este presente nos principais fármacos utilizados no tratamento da doença como a galantamina e donepezil (FORLENZA, 2005).

Segundo TREVISAN; MACEDO (2003), espécies inibidoras da acetilcolinesterase aumentam a função colinérgica do sistema nervoso. Por tanto, o uso de plantas medicinais que apresentam essa propriedade pode ser utilizada como tratamento alternativo dessa enfermidade. Nesta pesquisa foi utilizado o padrão eserina como controle positivo de inibição enzimática, que apresenta a estrutura química representada pela figura 13.

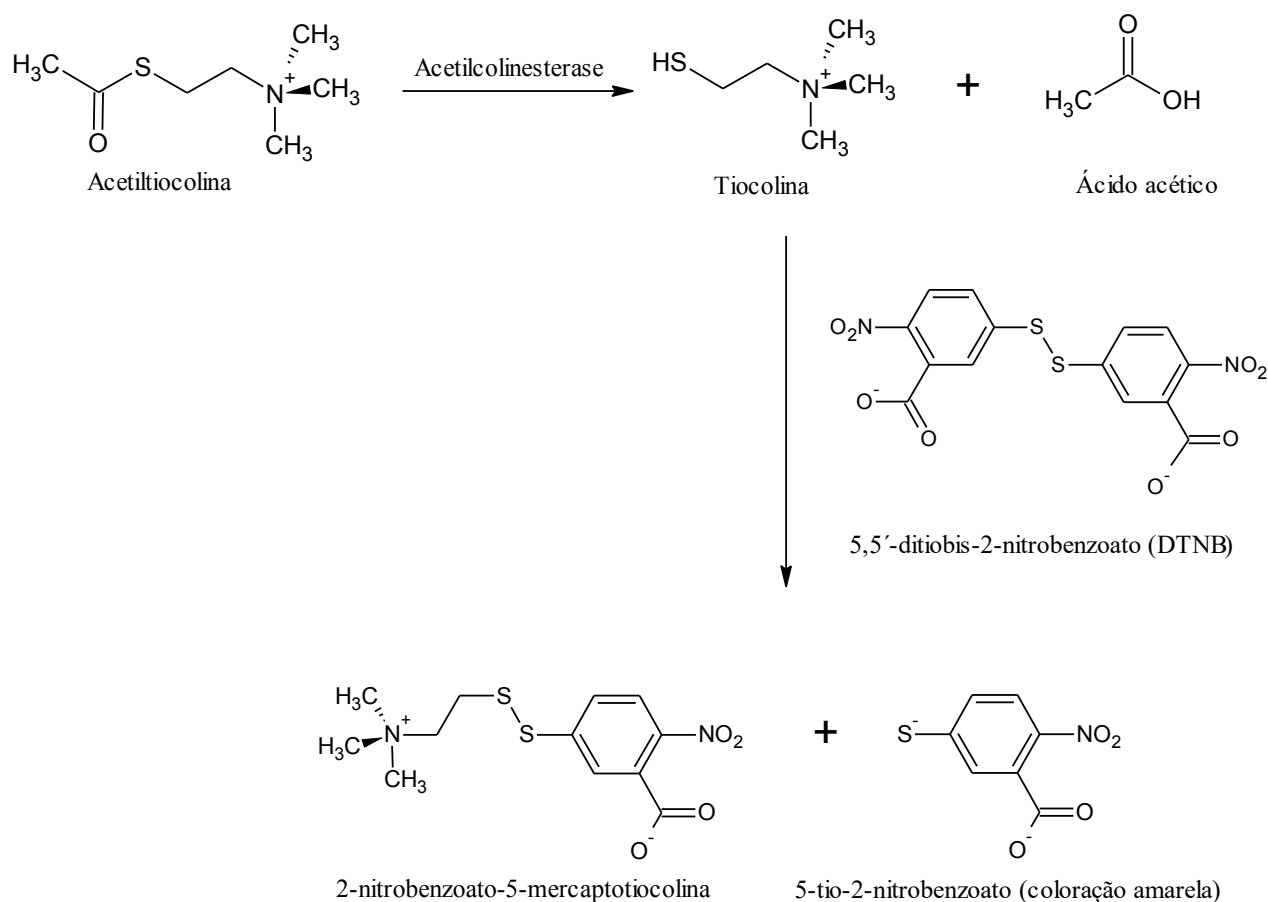
Figura 13 – Fórmula estrutural do padrão eserina.



Fonte: Autor (2023).

Esta pesquisa utilizou o método proposto por Ellman et al. (1961), modificado para CCD por Rhee et al. (2001). Trata-se de um método colorimétrico de análise de inibição da enzima acetilcolinesterase, nesse caso pela ação dos constituintes de extratos de cones e pellets de lúpulo. Na reação, a acetiltiocolina é utilizada como substrato inicial da reação, que pela ação da enzima acetilcolinesterase sofre hidrólise formando ácido acético e tiocolina. A tiocolina interage com o reagente de Ellman presente no meio formando o ânion 5-tio-2-nitrobenzoato, que apresenta coloração amarelada. O esquema reacional da ação da enzima acetilcolinesterase é apresentado na figura 14:

Figura 14 – Processo reacional de conversão da acetiltiocolina no ânion 5-tio-2-nitrobenzoato pela ação da enzima acetilcolinesterase e reação com DTNB.



Fonte: Autor (2023).

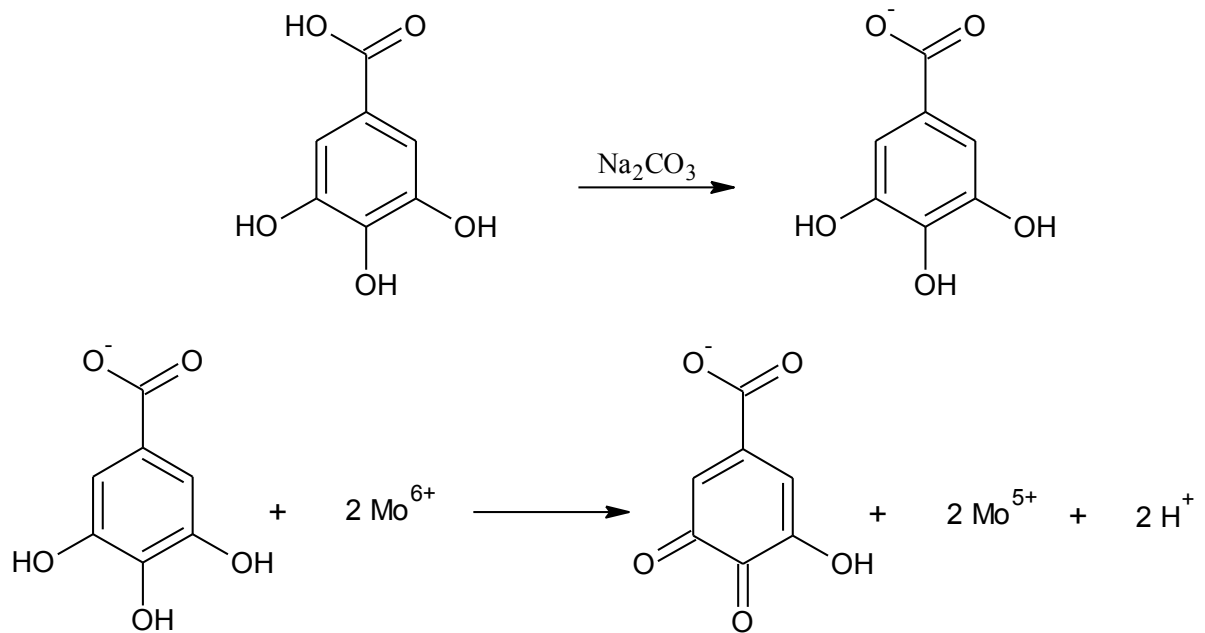
3.6 Teor de Fenólicos Totais (TFT)

Um método amplamente relatado na literatura de quantificação dos compostos fenólicos presentes em extratos vegetais é o método de Folin-Ciocalteu (F-C), no qual utiliza-se um reagente denominado de reagente de Folin-Ciocalteu, que apresenta em sua composição ácidos fosfotúngstico e fosfomolibdico, com coloração amarela devido a presença do complexo $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, nos quais o molibdênio apresenta estado de oxidação +6 (VI) (NASCIMENTO, 2019). Esses ácidos reagem com compostos fenólicos em um processo de oxirredução, em meio básico, devido a presença de carbonato de sódio, formando o complexo de molibdênio-tungstênio $[(\text{PMoW}_{11}\text{O}_4)^{-4}]$, que apresenta coloração azul, no qual os metais apresentam estado de oxidação médio entre +5 (V) e +6 (VI) (NASCIMENTO, 2019). Segundo Cicco et al. (2009), a quantificação das absorvâncias no ensaio de F-C, podem ser

determinadas num intervalo de 700-760 nm.

O ácido gálico é frequentemente utilizado como controle positivo no ensaio de determinação do teor de fenólicos totais pelo método de F-C, representando os resultados obtidos para as amostras em equivalente de ácido gálico por massa de extrato (mg EAG g^{-1}) (GÜLÇİN, 2011). A figura 15 ilustra a reação do ácido gálico com o reagente de Folin-Ciocalteu em meio básico:

Figura 15 – Esquema reacional do método Folin-Ciocalteu.



Fonte: Autor (2023).

4 METODOLOGIA

Essa seção é destinada para descrever todos os reagentes, os equipamentos e os procedimentos experimentais realizados nesta pesquisa.

4.1 Lista de Reagentes

Água deionizada; hexano, metanol e acetonitrila adquiridos de Bio-Grade® (Durham, Estados Unidos); ácido clorídrico e bicarbonato de sódio de Synth® (Diadema, São Paulo); sulfato de magnésio de Êxodo Científica® (Sumaré, São Paulo); ácido acético e cloreto de magnésio de Dinâmica (Indaiatuba, São Paulo); reagente de Folin-Ciocalteu da Merck® (Darmstadt, Alemanha); cloreto de sódio de Neon (Suzano, São Paulo); fosfato de potássio monobásico e dibásico, hipoxantina, cloreto férrico hexahidratado, ácido salicílico, ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), DPPH* (1,1-difenil-2-picrilhidrazil), ABTS^{•+} [2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)], *p*-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo (*p*-NPG), iodeto de acetiltiocolina, ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) - DTNB, albumina sérica bovina fração V, Tris/HCl, xanthohumol, mangiferina, xantina oxidase de leite bovino, α -glicosidase (*Saccharomyces cerevisiae*) e acetilcolinesterase (*Electrophorus electricus*) todos obtidos de Sigma-Aldrich® (Saint Louis, Estados Unidos); acarbose (Glucobay®) da Bayer® (Leverkusen, Alemanha); extrato de Calibração Internacional de Lúpulo ICE-4 (mistura padrão de ácidos amargos, pureza 69,2%) foi obtido de Labor Veritas (Zurique, Suíça).

4.2 Preparo de soluções-tampão

A solução-tampão fosfato de potássio (pH = 6,6) foi utilizada como solvente no ensaio antioxidante de radicais hidroxila e de inibição da enzima xantina oxidase. Para o preparo de 500 mL de solução-tampão foi pesado 73,0 mg de ácido etilediaminotetracético (EDTA), 32,7 mg de cloreto férrico hexahidratado, 20,5 mg de hipoxantina, 138,0 mg de ácido salicílico e em seguida adicionou-se água deionizada para solubilização dos constituintes e transferiu-se a solução para um balão volumétrico de 500 mL. Em seguida, adicionou-se 19,05 mL de uma solução de K₂HPO₄ (1 mol L⁻¹) e 30,95 mL de uma solução de KH₂PO₄ (1 mol L⁻¹), aferiu-se o balão volumétrico com água deionizada e manteve-se o sistema em agitação magnética, por um período de 3 h.

Para o ensaio de inibição da enzima α -glicosidase, utilizou-se como solvente a

solução-tampão fosfato de potássio 50 mmol L⁻¹ (pH = 6,8). Para o preparo solubilizou-se 3,696 g de fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄) e 3,978 g de fosfato de potássio dibásico (K₂HPO₄) em água deionizada, e em seguida aferiu-se a solução em um balão volumétrico de 1.000 mL.

4.3 Material vegetal

Pellets comerciais, de duas variedades de flores de lúpulo (Saaz - Hallertau® e Herkules - Barth-Haas Group®), foram comprados em loja de insumos cervejeiros na cidade de Fortaleza (Brasil), possuindo mais de 2 anos de estocagem até o período de análise.

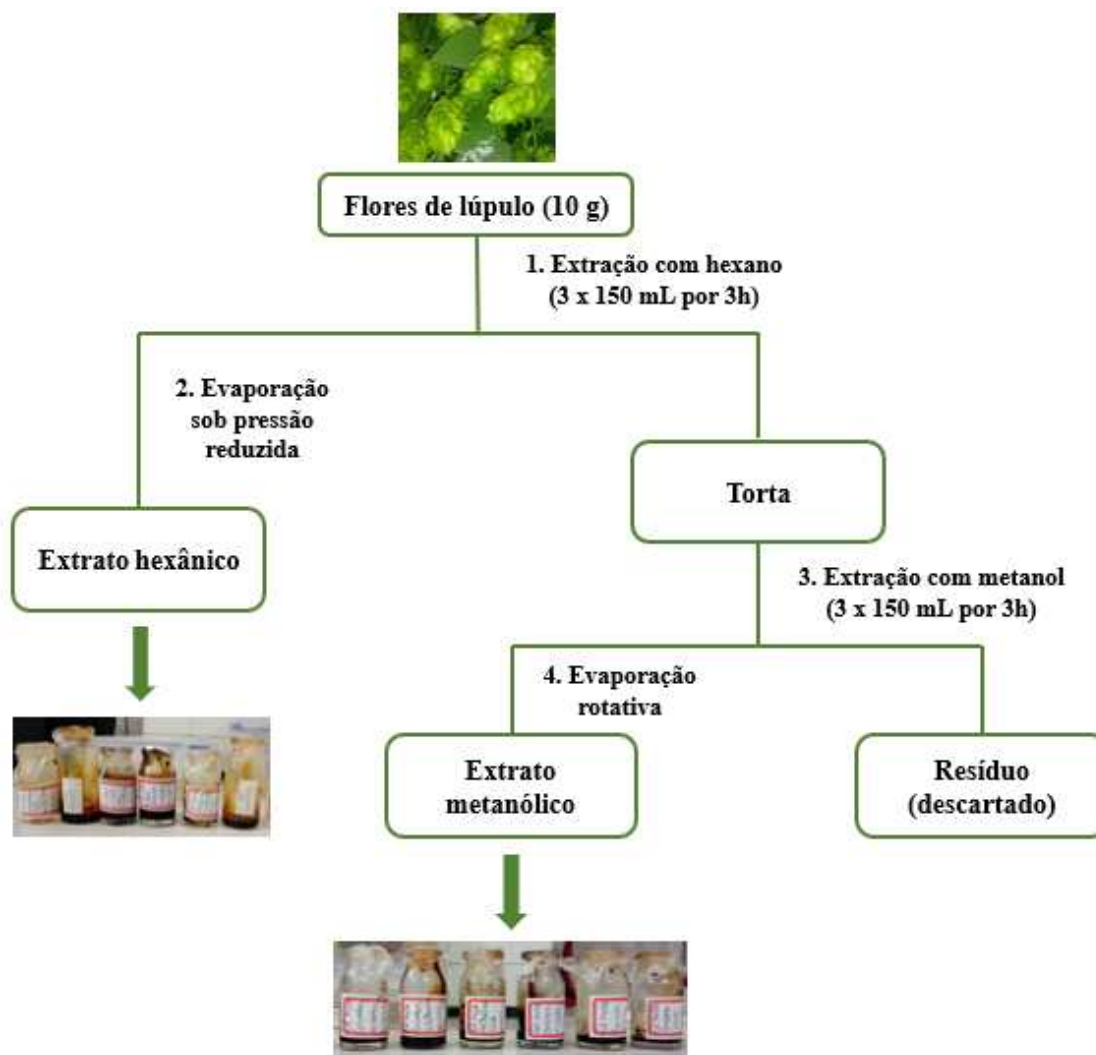
Cones de lúpulo da cultivar Chinook (Chinook-1: plantas maduras / Chinook-2: primeira floração) e Cascade (primeira floração), foram fornecidas por dois integrantes da Associação Brasileira de Produtores de Lúpulo (Aprolúpulo®), com suas plantações nas cidades de Brasília (Distrito Federal) – referente a variedade Chinook-1, e Monte Alegre (Rio Grande do Norte) – referente as cultivares Chinook-2 e Cascade. As amostras foram recebidas em embalagens metalizadas seladas à vácuo, com umidade entre 8 - 12 % (m/m). Estes cones foram coletados em plantas replicadas de mudas importadas com certificação e registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), adquiridas do viveiro Lúpulo Ninkasi® (Teresópolis, Brasil). Todas as amostras foram mantidas refrigeradas a 5 °C até período de análises.

4.4 Obtenção dos extratos em hexano e em metanol via sistema Soxhlet

Os extratos das diferentes cultivares foram obtidos utilizando-se 10 g dos materiais vegetais secos e triturados através de sistema Soxhlet. Inicialmente foi realizada a extração dos ácidos amargos com hexano (150 mL), mantendo-se o sistema em funcionamento por 3 h. Realizou-se o procedimento com o solvente hexano 3 vezes. Em seguida as substâncias polifenólicas, entre elas o xanthohumol, foram extraídas utilizando metanol (150 mL). As soluções (em hexano e em metanol) foram concentradas através de evaporador rotativo e secas com fluxo de nitrogênio constante a temperatura ambiente. A extração com o solvente metanol foi realizada por três vezes (Marques et al., 2015).

A figura 16 ilustra os procedimentos realizados para a obtenção dos extratos:

Figura 16 – Fluxograma do processo de obtenção dos extratos por extração exaustiva.



Fonte: Autor (2023).

4.5 Teor de Fenólicos Totais – Método de Folin-Ciocalteu

Nesta pesquisa foi realizada uma adaptação ao método proposto por Cicco et al. (2009), objetivando menores gastos com reagentes produzindo sistemas em microtubos tipo Eppendorfs. Inicialmente foram preparadas soluções dos extratos em metanol das variedades de lúpulo analisadas (1 mg mL^{-1}), sendo então adicionadas aos microtubos $100 \mu\text{L}$ de solução. Em seguida adicionou-se $500 \mu\text{L}$ do reagente de Folin-Ciocalteu 10%, realizando agitação em vortex por 1 min para melhor solubilização do sistema. Para iniciar a reação, adicionou-se $400 \mu\text{L}$ de uma solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) 7,5% e iniciou-se a incubação a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ por 20 min sem agitação.

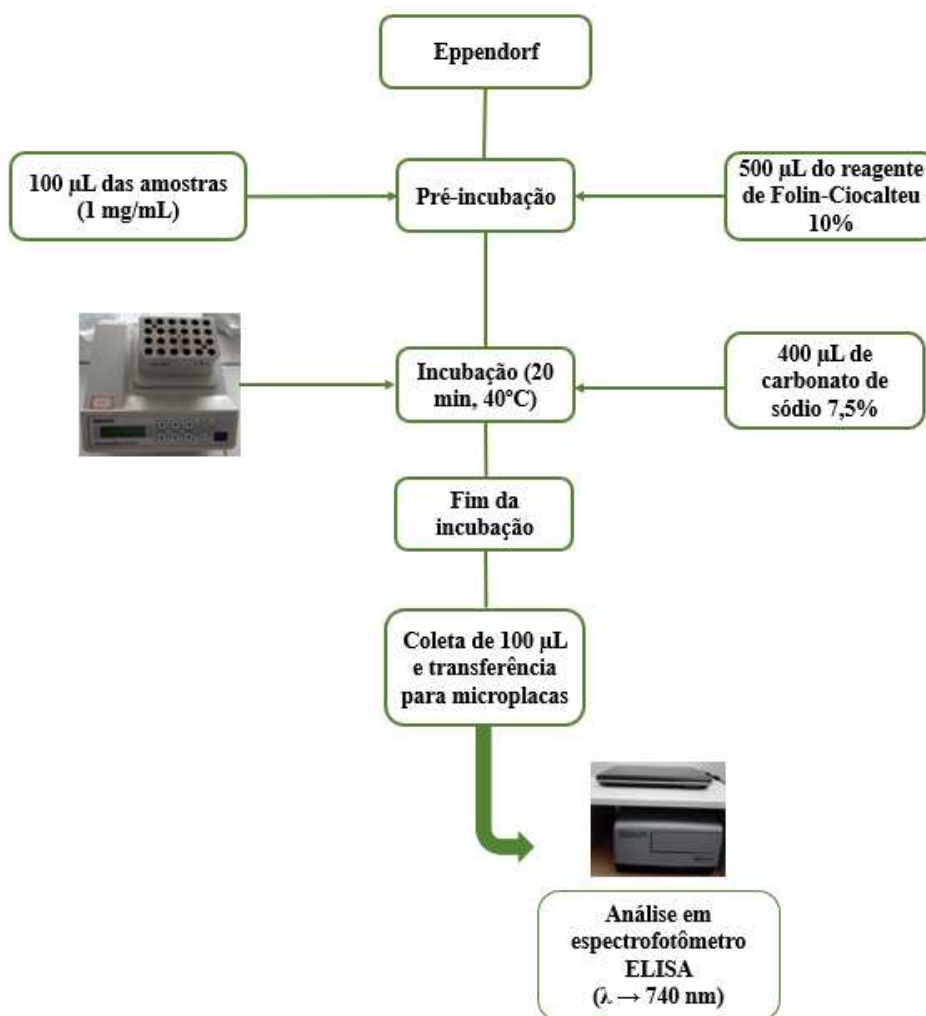
Após o período de incubação, coletou-se $100 \mu\text{L}$ de cada sistema em triplicata e

transferiu-se para uma microplaca para posterior leitura no espectrofotômetro ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* – Biotek, Winooski, Estados Unidos), com o objetivo de determinar a absorvância no comprimento de onda 740 nm.

O mesmo procedimento foi realizado com o padrão ácido gálico em distintas concentrações (2.500 - 19,53125 $\mu\text{g mL}^{-1}$), e em seguida construiu-se uma curva de calibração para determinação dos teores de fenólicos totais em mg de equivalente de ácido gálico por grama de extrato (mg EAG g^{-1}).

Através deste ensaio foi possível então efetuar comparações entre as variedades do lúpulo e os valores de teor de fenólicos totais e corroborar com os resultados provenientes dos ensaios antioxidantes. O procedimento experimental é representado pela figura 17:

Figura 17 – Fluxograma do teste de determinação do Teor de Fenólicos Totais.



Fonte: Autor (2023).

4.6 Ensaio antioxidante de combate ao radical DPPH[•]

Inicialmente foi preparada uma solução estoque do radical DPPH[•] com concentração 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$, visando o menor impacto da degradação do radical ao longo do tempo. Os procedimentos foram realizados conforme descreve Marques et al. (2015) com modificações, nas quais a solução de radical foi diluída para a concentração de 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Na microplaca adicionou-se 20 μL de soluções em metanol das amostras em distintas concentrações (0,015625 – 1 mg mL^{-1} para os padrões e extratos das variedades Herkules e Chinook-1 e 0,0625 – 4 mg mL^{-1} para os extratos das cultivares Chinook-2, Saaz e Cascade) em triplicata. A reação foi iniciada pela adição de 180 μL da solução metanólica do radical DPPH[•] em todos os poços da microplaca, por um período de 30 min na ausência de luz, realizando-se posteriormente a análise em 515 nm em um espectrofotômetro ELISA, comprimento este no qual é máxima a absorção do radical em análise (MARQUES et al., 2015). Além disso, devido a possibilidade de os extratos interferirem no valor da absorbância medido pelo espectrofotômetro, foram realizados brancos para todas as concentrações das amostras, sendo esse valor então descontando do valor medido do sistema contendo a solução dos extratos e o radical DPPH[•], podendo então ser calculado o real valor de absorbância do radical.

A porcentagem de inibição do radical DPPH[•] pelos extratos foram calculados tendo como base os valores de absorbância medida no ELISA. A porcentagem é calculada como:

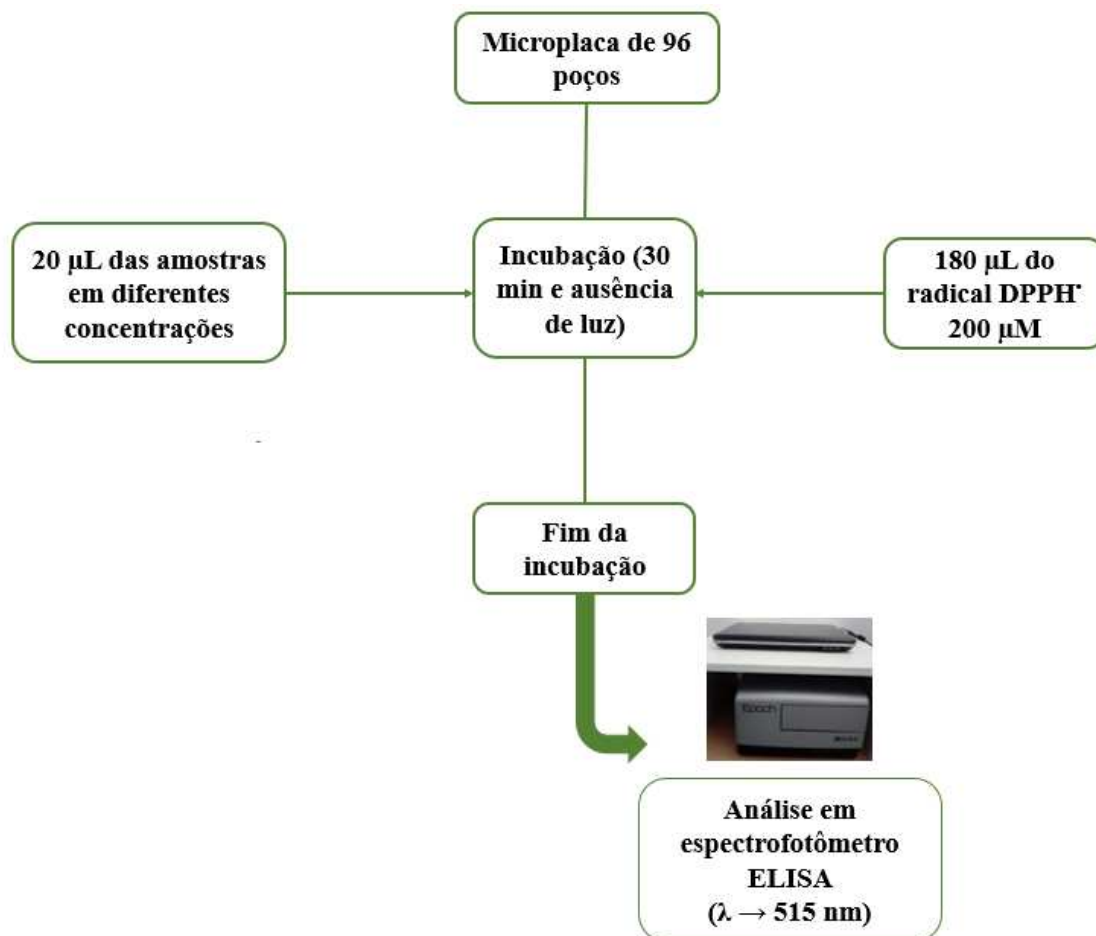
Equação 1 – Cálculo da determinação do percentual de inibição de radical DPPH[•].

$$\text{Inibição (\%)}: \text{ABS DPPH}^{\bullet}_{\text{controle}} - \text{ABS DPPH}^{\bullet}_{\text{sistema}} / \text{ABS DPPH}^{\bullet}_{\text{controle}}$$

Fonte: Autor (2023).

O BHT foi utilizado como padrão positivo neste ensaio e os cálculos de IC₅₀ para determinação da capacidade antioxidante foram realizados utilizando o software Origin 9,5®. A figura 18 ilustra o procedimento realizado para esta análise antioxidante:

Figura 18 – Fluxograma representativo do ensaio antioxidante DPPH[•].



Fonte: Autor (2023).

4.7 Ensaio antioxidante de combate ao radical ABTS^{•+}

Para determinação da capacidade antioxidante frente ao radical ABTS^{•+}, realizou-se uma adaptação do método proposto por Torres et al. (2017). O radical sintetizado foi obtido a partir da reação de 5 mL de solução aquosa de ABTS (7 mmol L⁻¹) com 88 µL de solução de persulfato de potássio (140 mmol L⁻¹) por 16 h na ausência de luz (TORRES et al., 2017).

Adicionou-se 20 µL de solução metanólica dos extratos e padrões em sete distintas concentrações (0,015625 – 1 mg mL⁻¹ para os padrões e extratos das variedades Herkules e Chinook-1 e 0,0625 – 4 mg mL⁻¹ para os extratos das cultivares Chinook-2, Saaz e Cascade) em microplacas, seguido da adição de 180 µL de solução metanólica de radical ABTS^{•+} e posterior análise por espectrofotometria (ELISA), no comprimento de 734 nm.

Os cálculos dos percentuais de inibição do radical ABTS^{•+} foram realizados baseando-se nos valores de absorbância medidos no ELISA para cada sistema do ensaio:

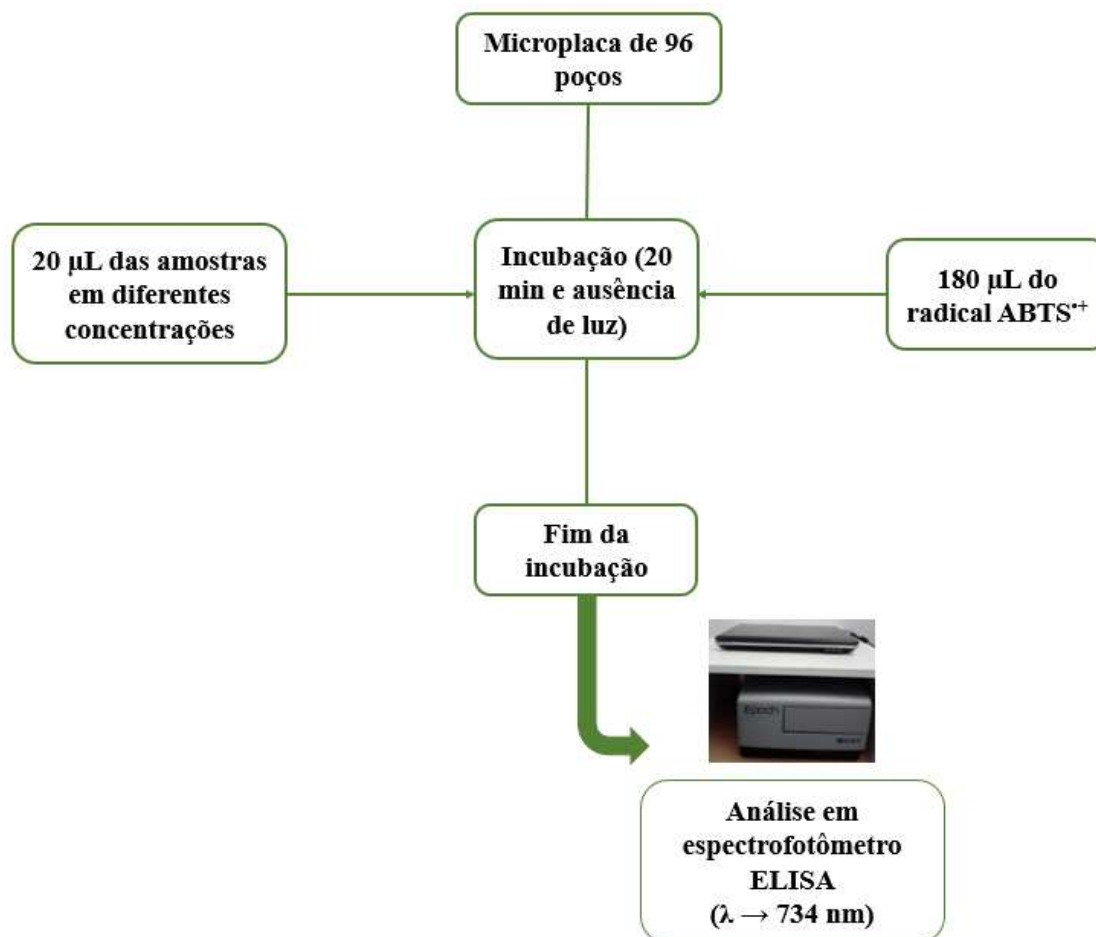
Equação 2 – Cálculo da determinação do percentual de inibição do radical ABTS^{•+}.

$$\text{Inibição (\%)}: \text{ABS ABTS}^{\bullet+}_{\text{controle}} - \text{ABS ABTS}^{\bullet+}_{\text{sistema}} / \text{ABS ABTS}^{\bullet+}_{\text{controle}}$$

Fonte: Autor (2023).

O antioxidante comercial BHT foi utilizado como controle positivo e os cálculos de IC₅₀ foram realizados utilizando o software Origin 9,5®. O processo metodológico do ensaio ABTS^{•+} é ilustrado pela figura 19:

Figura 19 – Fluxograma de análise do potencial antioxidante de sequestro do cátion radical ABTS^{•+}.



Fonte: Autor (2023).

4.8 Ensaio antioxidante de combate ao radical hidroxila e de inibição da enzima xantina oxidase

Para realização do procedimento de análise do potencial antioxidante frente aos radicais hidroxila e de inibição da enzima xantina oxidase, utilizou-se como solvente do meio reacional uma solução-tampão fosfato de potássio (pH = 6,6), que contém em sua composição ácido etilediaminotetracético (EDTA), cloreto férrico hexahidratado, hipoxantina e ácido salicílico.

Os ensaios relacionados à análise antioxidante utilizando o sistema hipoxantina/xantina oxidase baseia-se na inibição de formação dos ácidos 2,5 e 2,3-DHBA (*dihydroxybenzoic acid* - ácido dihidroxibenzoico). Para análise da capacidade antioxidante dos extratos frente a este sistema preparou-se inicialmente soluções metanólicas de concentração de 10.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para todos os extratos/padrões e 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para o xanthohumol, e em seguida coletou-se volumes pré-determinados (10, 25, 50, 100, 250 e 500 μL), adicionou-os em microtubos tipo Eppendorfs e o sistema então foi deixado sob a bancada a temperatura ambiente por 24 h para completa evaporação do solvente, obtendo então massas específicas dos extratos (OWEN et al., 2000; MARQUES et al., 2015; MARQUES, 2017).

Após a secagem completa do solvente, adicionou-se 1 mL de tampão fosfato (pH = 6,6) e homogeneizou-se a nova solução em vortex por 1 min e banho ultrassônico por 10 min, para maximizar a solubilização do extrato. Após o período de solubilização, adicionou-se 10 μL da enzima xantina oxidase (18 mU mL^{-1}) e utilizou-se o vórtex por 10 s em cada sistema para solubilização da enzima. Realizou-se a incubação das amostras por 3 h, 450 rpm e 37 °C, e ao final do processo adicionou-se 10 μL de ácido clorídrico concentrado para inativação da enzima (OWEN et al., 2000; MARQUES et al., 2015; MARQUES, 2017).

Após o período de incubação todos os microtubos tipo Eppendorfs foram centrifugados à 13.000 rpm durante 5 min e em seguida coletou-se 100 μL do sobrenadante para análise no CLAE-DAD no comprimento de onda de 325 nm. Em relação as condições operacionais do equipamento, foi utilizado um volume de injeção de 1 mL min^{-1} e o volume de injeção utilizado foi de 10 μL . A fase móvel utilizada foi uma mistura de metanol (solvente A) e ácido acético 2% (solvente B) com fluxo em gradiente.

O cálculo para medição do valor dos percentuais de inibição dos 2,5 e 2,3-DHBA se baseou na seguinte equação:

Equação 3 – Cálculo da determinação do percentual de inibição de DHBA.

$$\text{Inibição (\%)}: \frac{\text{Concentração DHBA}_{\text{controle}} - \text{Concentração DHBA}_{\text{sistema}}}{\text{Concentração DHBA}_{\text{controle}}}$$

Fonte: Autor (2023).

Após o cálculo dos percentuais de inibição dos DHBA, utilizou-se esses valores e os de concentrações dos extratos nos sistemas para realização dos cálculos de IC₅₀, em µg mL⁻¹.

Os ensaios de análise de inibição da enzima xantina oxidase foram realizados utilizando o mesmo sistema para a análise do potencial antioxidante, baseando-se na quantificação de ácido úrico formado no final do processo. As condições reacionais utilizadas foram iguais às de análise antioxidante descritas anteriormente, diferindo apenas na substância de análise, o ácido úrico. A quantificação deste foi realizada a 278 nm no CLAE-DAD, e os cálculos para determinação de inibição da enzima foram realizados em termos de concentração de ácido úrico observada em solução no final da incubação para cada sistema quando comparados ao controle.

As condições operacionais do cromatógrafo líquido utilizadas para os ensaios de capacidade antioxidante e de inibição da enzima xantina oxidase são descritas pela figura 20:

Figura 20 – Configurações do cromatógrafo líquido acoplado a detector de arranjo de diodos para análises frente ao sistema hipoxantina/xantina oxidase.



☐ Coluna de fase reversa: C-18 (Agilent eclipse plus)

- Dimensões: 4,6 x 100 mm
- Preenchimento: 3.5 µm

☐ Detecção: 278 e 324 nm.

☐ Injeção: 10 µL de solução (1 mL min⁻¹).

☐ Fases móveis: ácido acético 2% (AA) e metanol.

Tempo	Metanol (solvente A)	Ácido acético 2% (solvente B)
0 a 11 min	0%	100%
11 a 35 min	20%	80%
35 a 40 min	40%	60%
40 a 45 min	0%	100%
45 a 50 min	75%	25%

Fonte: Autor (2023).

Os percentuais de inibição de ácido úrico foram calculados de acordo com a equação a seguir:

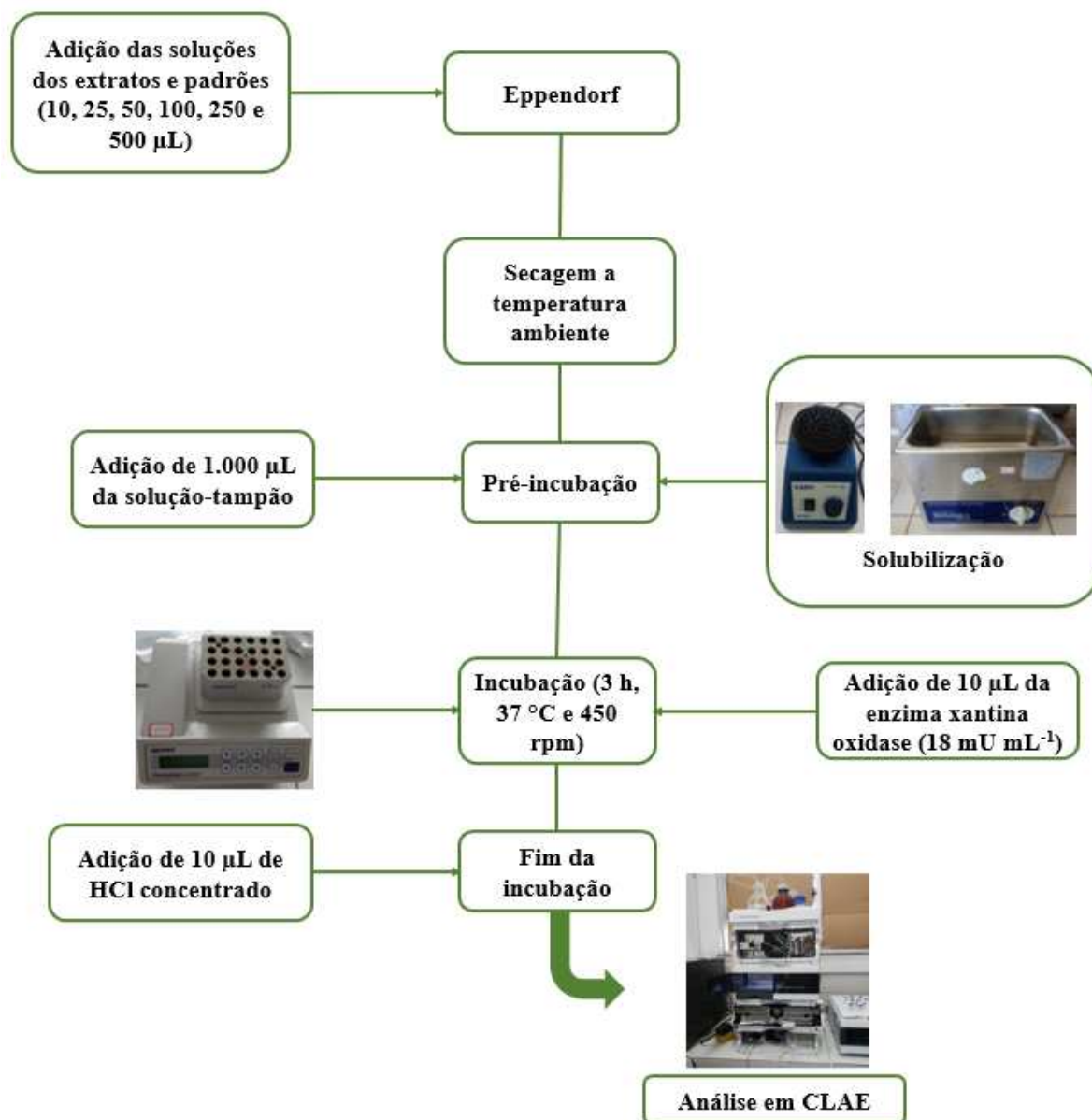
Equação 4 – Cálculo do percentual de inibição da enzima xantina oxidase.

$$\text{Inibição (\%)} = \frac{\text{Concentração AU}_{\text{controle}} - \text{Concentração AU}_{\text{sistema}}}{\text{Concentração AU}_{\text{controle}}}$$

Fonte: Autor (2023).

Dessa forma, obtendo-se os valores de inibição e os valores de concentração dos extratos em cada sistema, realizou-se um gráfico de percentual de inibição de ácido úrico por concentração de solução dos extratos para determinação do valor de IC₅₀. A figura 21 apresenta um fluxograma das etapas envolvidas na realização dos ensaios:

Figura 21 – Fluxograma da análise frente ao sistema hipoxantina/xantina oxidase.



Fonte: Autor (2023).

4.9 Ensaio de inibição da enzima α -glicosidase

O procedimento de análise inibitória da enzima α -glicosidase foi realizado conforme descreve Nascimento et al. (2023), com pequenas alterações. A solução-tampão fosfato de potássio com pH = 6,8 foi utilizado como solvente no ensaio de inibição da enzima α -glicosidase. Os reagentes utilizados para o procedimento experimental foram o reagente *p*-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo (*p*-NPG) com concentração 1 mmol L⁻¹, a enzima α -glicosidase com concentração 1 U mL⁻¹ e uma solução aquosa 10% de bicarbonato de sódio (NaHCO₃).

Para realização dos ensaios de inibição da enzima α -glicosidase foram preparadas soluções em diferentes concentrações na solução-tampão dos extratos/ICE-4 (15,625 – 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$), do xanthohumol (3,90625 – 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e do medicamento acarbose (78,125 – 10.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Inicialmente, no processo denominado de pré-incubação, adicionou-se em microtubos tipo Eppendorf 20 μL dos extratos em diferentes concentrações e 20 μL da enzima α -glicosidase, seguido de ambientação por 5 min para permitir uma completa dissolução de todos os componentes.

Após o intervalo de 5 min, adicionou-se em cada um dos microtubos 40 μL do reagente *p*-NPG para assim dar início a reação, sendo essa etapa do processo denominada de incubação, realizado em um período de 30 min a 37°C, sem agitação. Após o período de 30 min foi adicionado 100 μL de uma solução de bicarbonato de sódio 10% em todos os sistemas para finalização da reação de hidrólise. Por fim, coletou-se 100 μL de solução de cada microtubo para leitura no espectrofotômetro ELISA em 405 nm, para determinação do valor de absorbância, da porcentagem de inibição e dos valores de IC_{50} . É importante a realização neste mesmo ensaio de um branco, para cada valor de concentração dos extratos/padrões, para assim analisar se o reagente *p*-NPG e os extratos/padrões interferem nas medidas de absorbância. A porcentagem de inibição das amostras foi determinada conforme apresenta a equação 5:

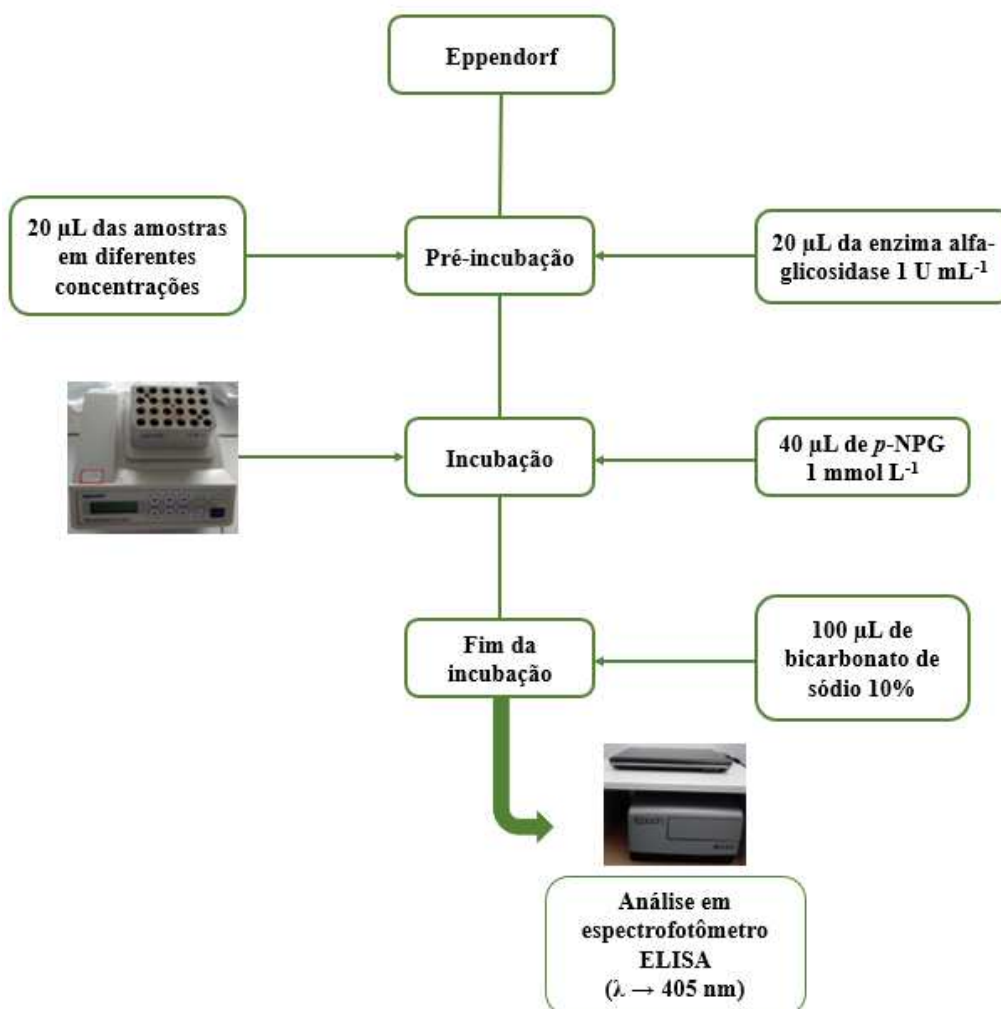
Equação 5 – Cálculo do percentual de inibição da α -glicosidase.

$$\text{Inibição \%} = \frac{\text{ABS}_{\text{controle}} - \text{ABS}_{\text{sistema}}}{\text{ABS}_{\text{controle}}}$$

Fonte: Autor (2023).

Para determinação do valor de IC_{50} , plotou-se um gráfico de inibição pela concentração de extrato no sistema para comparação da eficácia de inibição dos extratos com o medicamento acarbose, o controle positivo do ensaio. O procedimento experimental realizado é representado pela figura 22:

Figura 22 – Fluxograma do ensaio enzimático de inibição da α -glicosidase.



Fonte: Autor (2023).

4.10 Ensaio de inibição da enzima acetilcolinesterase

A metodologia utilizada nesta pesquisa para realização da análise de inibição da enzima acetilcolinesterase, baseou-se no procedimento proposto por Ellman et al. (1961), e modificado por Rhee et al. (2001) para análise em placas de CCD. Trata-se de um método qualitativo de rápida análise para seleção de amostras com atividade anticolinesterásica. Os compostos químicos que apresentam inibição desta enzima, são indicados pela literatura como possíveis produtos farmacológicos para o tratamento da doença de Alzheimer (TREVISAN; MACEDO, 2003).

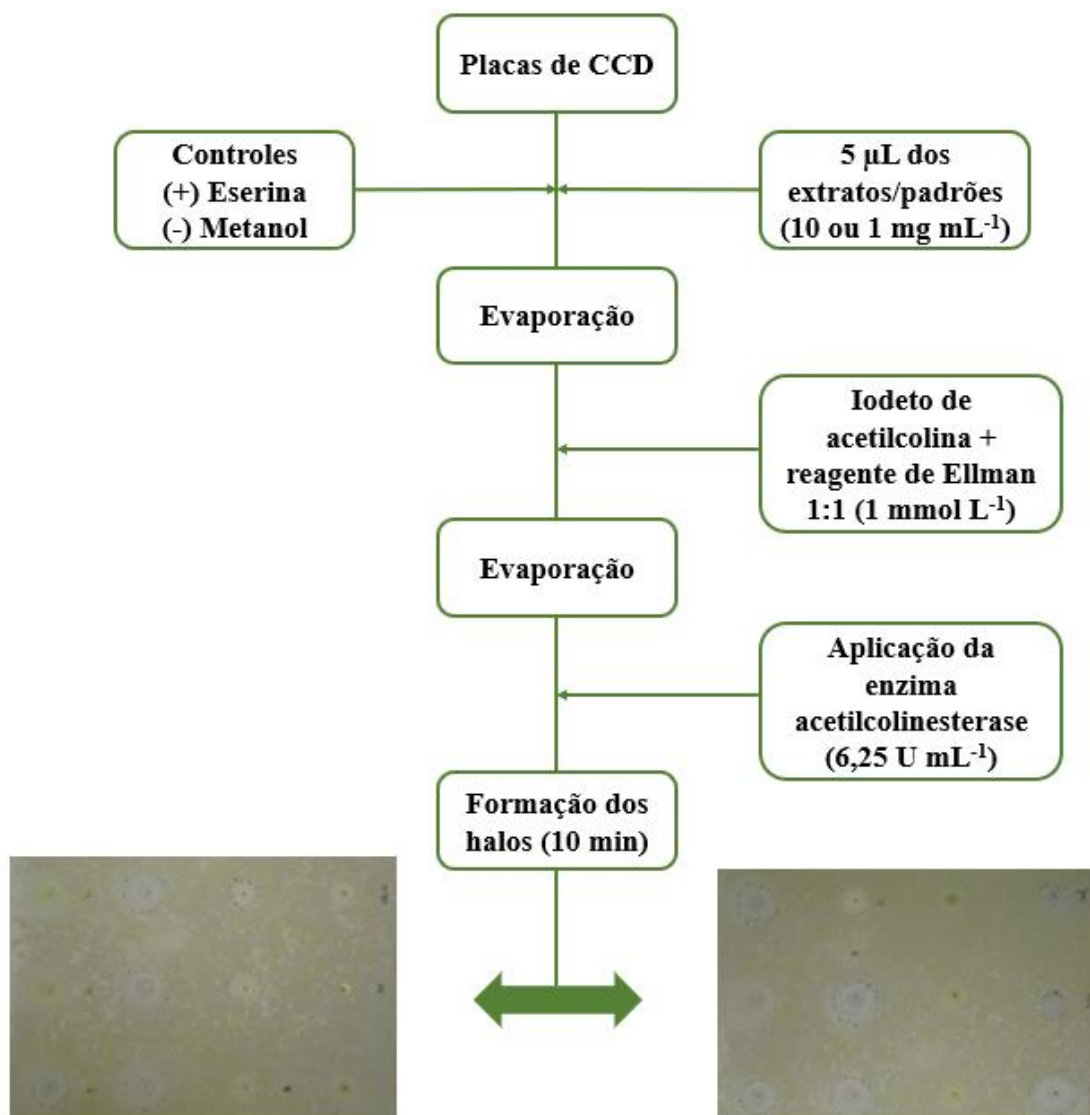
Preparou-se uma solução 50 mmol L^{-1} de tampão Tris/HCl a partir da diluição de $12,5 \text{ mL}$ de solução padrão 1 mol L^{-1} para 250 mL com água deionizada (solução 1). Em seguida, diluiu-se 100 mg de albumina sérica bovina fração V em 100 mL da solução 1

obtendo uma nova solução com concentração 0,1% de BSA fração V (solução 2), que foi utilizada para solubilização da enzima acetilcolinesterase (100 U mL^{-1}). Solubilizou-se também em 100 mL da solução 1 os valores de massa iguais a 0,584 g de NaCl e 0,406 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (solução 3), para posterior solubilização do reagente de Ellman - DTNB. As soluções de iodeto de acetilcolina e do reagente de Ellman, ambas em concentração 1 mmol L^{-1} , foram preparadas dissolvendo 14,459 e 19,818 mg dos reagentes, respectivamente, em 50 mL de água deionizada e 50 mL da solução 3, nessa ordem, em diferentes balões volumétricos. Por fim, utilizou-se a solução 2, para dissolver a enzima, diluindo 100 μL da enzima 100 U mL^{-1} em 1.600 μL de solução BSA V (0,1%) obtendo uma solução com concentração final de enzima acetilcolinesterase igual a $6,25 \text{ U mL}^{-1}$.

Inicialmente adicionou-se 5 μL das soluções metanólicas de extratos e do ICE-4, 10 mg mL^{-1} , e xanthohumol, 1 mg mL^{-1} , em uma cromatoplaça. Em seguida, após completa evaporação do solvente, foi borrifada uma mistura, na proporção 1:1, das soluções de iodeto de acetilcolina 1 mmol L^{-1} e reagente de Ellman 1 mmol L^{-1} [(Ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) - DTNB)]. A cromatoplaça foi deixada em repouso para secagem.

A solução de enzima acetilcolinesterase ($6,25 \text{ U mL}^{-1}$) foi borrifada sobre a cromatoplaça, para início de ensaio de análise inibitória. Após 10 min de procedimento, observou-se a permanência da coloração amarelada nos spots das amostras que não apresentaram inibição enzimática, mas foi evidenciado o surgimento de halo branco nas marcações correspondentes as amostras com atividade anticolinesterásica. Os diâmetros (mm) dos halos das amostras e padrões que apresentaram ação inibitória foram determinados e comparados com o controle positivo do ensaio, a eserina (1 mg mL^{-1}). A figura 23 ilustra o procedimento experimental do ensaio de inibição da enzima acetilcolinesterase:

Figura 23 – Fluxograma do ensaio de inibição da enzima acetilcolinesterase.



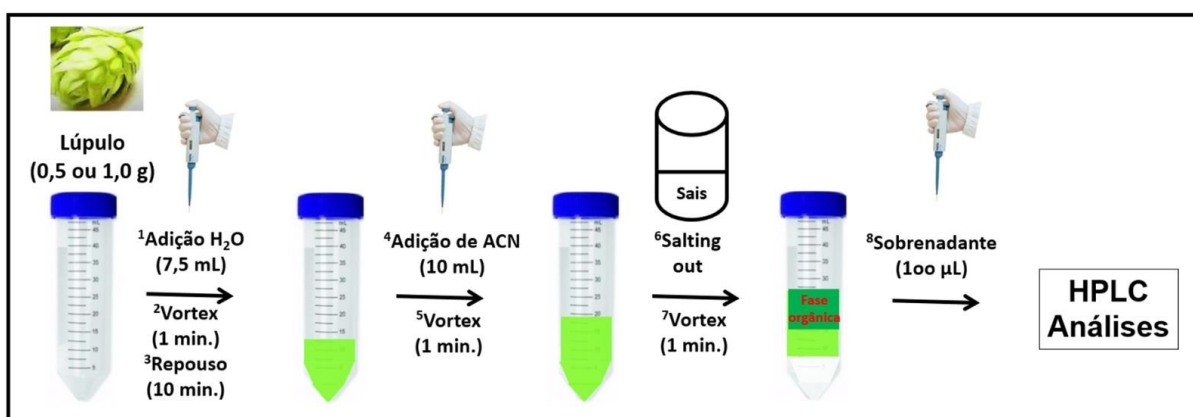
Fonte: Autor (2023).

4.11 Quantificação química de ácidos amargos e xanthohumol utilizando extração QuEChERS e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE – DAD)

Para quantificação química das espécies majoritárias presentes nas amostras de pellets comerciais e flores de lúpulo avaliadas neste trabalho, o método de extração QuEChERS proposto por Marques et al. (2022) foi aplicado. A massa de 1 g das amostras foram inseridas em tubos tipo Falcon (50 mL), seguido da adição de 7,5 mL de água deionizada e agitação dos sistemas em vórtex por 1 min. Após 10 min de repouso foram inseridos 10 mL de acetonitrila (solvente extrator), seguido de agitação por 1 min. Em seguida uma mistura de sais (6,0 g de sulfato de magnésio, 1,5 g citrato monobásico, 1,5 g de cloreto

de sódio e 0,75 g de citrato básico) foi adicionada para promover a separação da fase aquosa e da fase orgânica (*salting out*). A solução sobrenadante foi coletada e diluída em acetonitrila (1:10 – 1:20) para posterior análise cromatográfica. A figura 24 representa o procedimento experimental envolvido na realização da extração QuEChERS seguido da análise em cromatógrafo líquido:

Figura 24 – Processo metodológico da extração QuEChERS e determinação do teor de ácidos amargos e xanthohumol por CLAE-DAD.



Fonte: Autor (2023).

As curvas padrão de calibração para a quantificação dos ácidos amargos (α e β) foram obtidas a partir de sete soluções ($n = 7$) do extrato de calibração internacional de lúpulo (ICE – 4) em diferentes concentrações (0,25 – 4 mg mL⁻¹), e para o xanthohumol foram preparadas seis soluções ($n = 6$) a partir do composto puro (0,006 – 0,18 mg mL⁻¹), ambos os padrões dissolvidos em acetonitrila.

As avaliações cromatográficas foram realizadas utilizando CLAE-DAD (Agilent 1260 Infinity, Alemanha), equipado com coluna de fase reversa C-18 (Agilent eclipse plus – 3.5 μ m, 4.6 \times 100 mm). A fase móvel utilizada nas análises foi composta pelos solventes metanol (solvente A), solução aquosa de ácido acético 2% (solvente B), com tempo de corrida cromatográfica de 35 min, uma taxa de fluxo de solvente de 1,0 mL min⁻¹ e os volumes de injeção utilizados variaram de 10 – 20 μ L. A concentração dos solventes por tempo de corrida cromatográfica (eluição) e as configurações do equipamento estão apresentados na figura 25.

Figura 25 – Configurações do cromatógrafo líquido acoplado a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) utilizado para análise das flores de lúpulo.



☐ Coluna de fase reversa: C-18 (Agilent eclipse plus)

- Dimensões: 4,6 x 100 mm
- Preenchimento: 3.5 μm

☐ Detecção: 257, 278, 324 e 340 nm.

☐ Injeção: 10 μL de solução (1 mL min^{-1})

Tempo	Metanol (solvente A)	Ácido acético 2% (solvente B)
0 a 5 min	75%	25%
5 a 15 min	100%	0%
15 a 35 min	75%	25%

Fonte: Autor (2023).

O cromatógrafo foi programado para detecção dos compostos de interesse em quatro diferentes comprimentos de onda (254, 278, 326 e 340 nm), nos quais os ácidos amargos apresentaram melhor resolução no comprimento de 326 nm e o xanthohumol em 340 nm, por tanto, estes foram os comprimentos escolhidos para quantificação destes compostos. As curvas padrão de calibração, tratamentos estatísticos e cálculos das concentrações dos compostos (em $\text{g } 100\text{g}^{-1}$), foram realizados usando o software Microsoft Excel 365.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

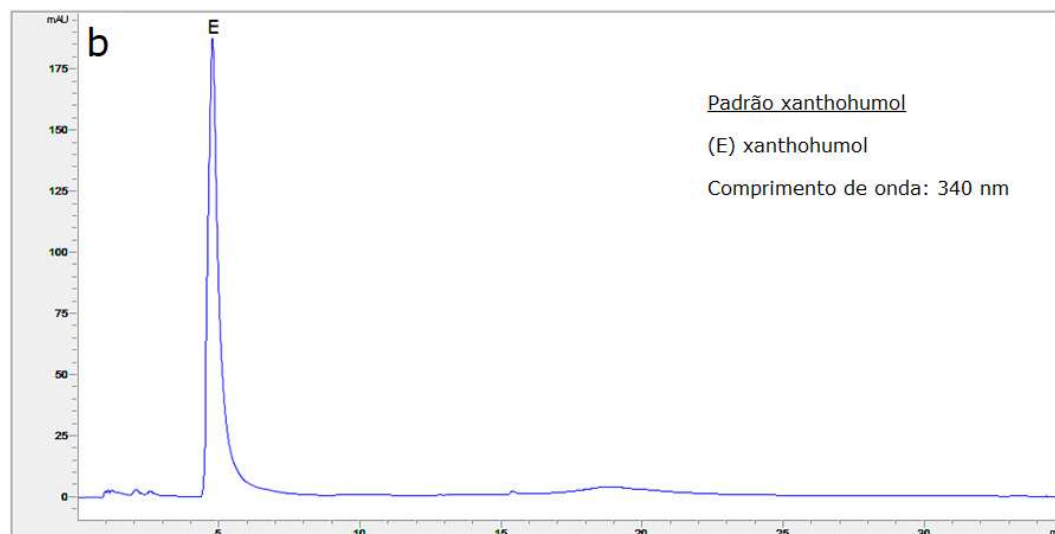
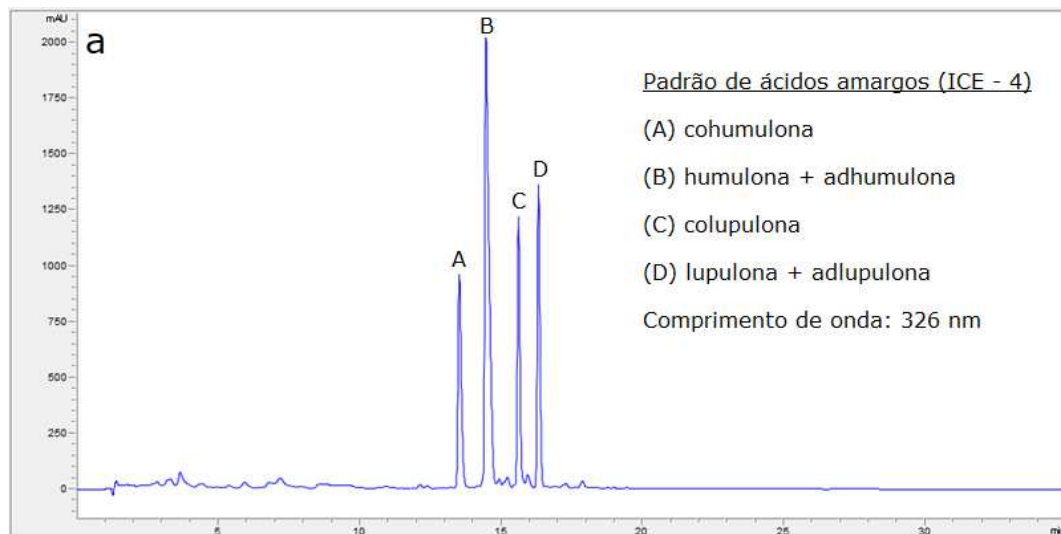
Nesta seção será discutida todos os dados obtidos referentes ao método de extração dos ácidos amargos e xanthohumol, e aos ensaios para determinação das propriedades antioxidantes e farmacológicas (de inibição enzimática) de extratos de lúpulo.

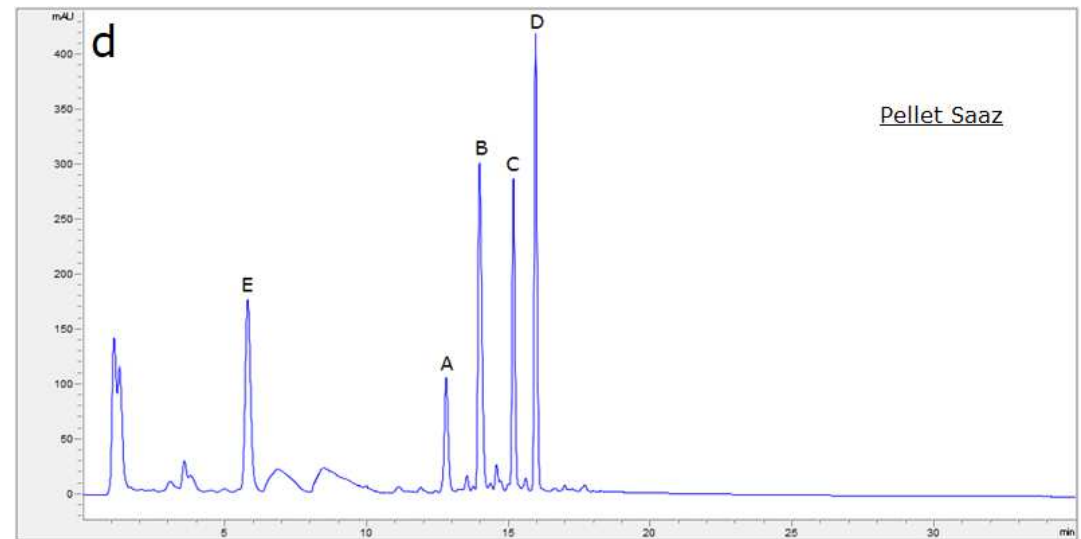
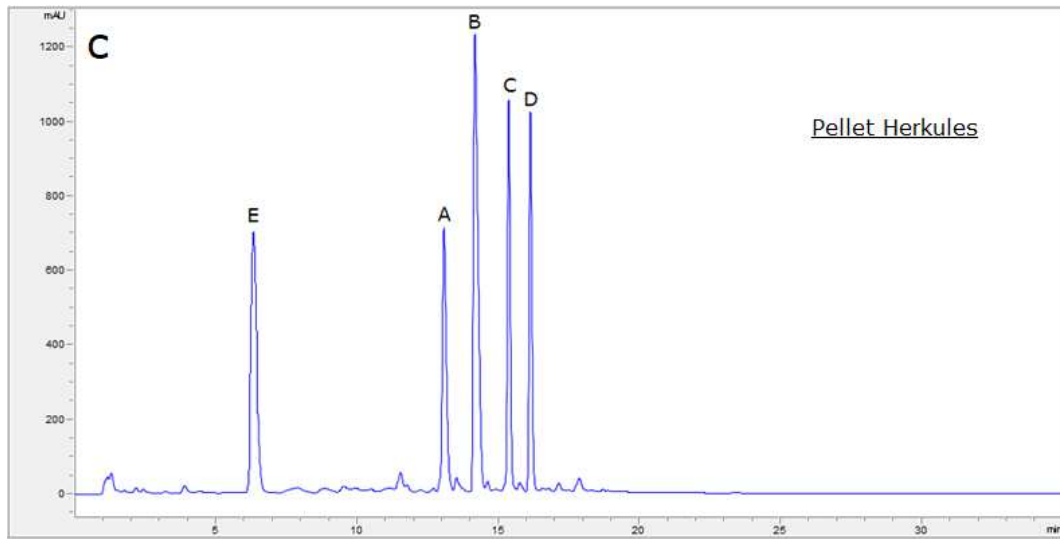
5.1 Análise qualitativa e quantitativa dos constituintes químicos utilizando cromatografia líquida de alta performance (CLAE – DAD)

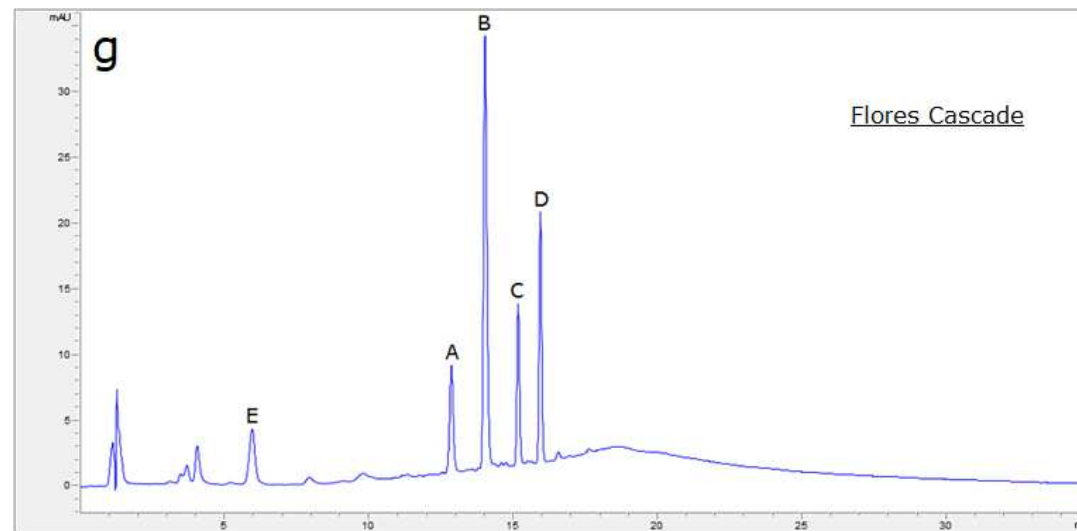
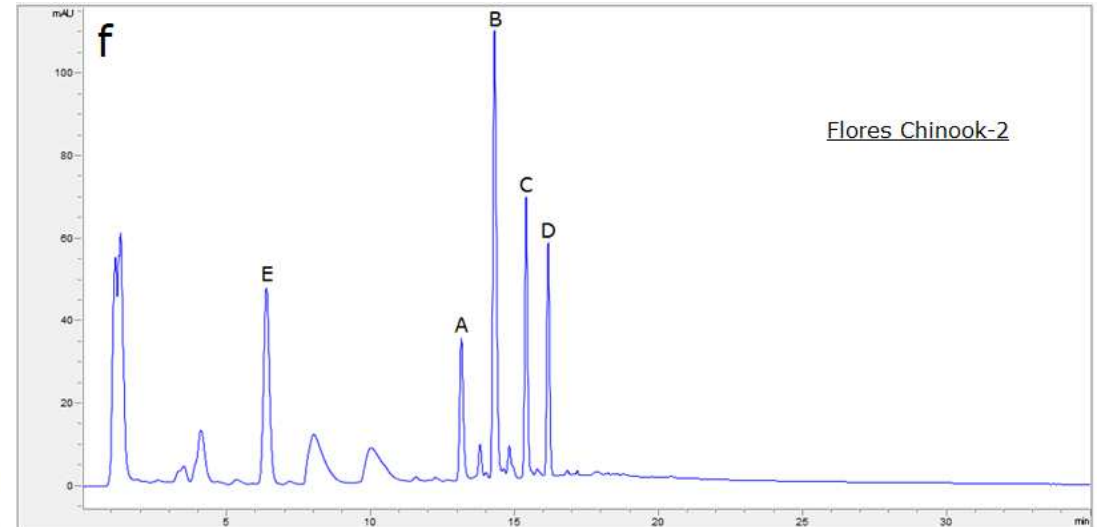
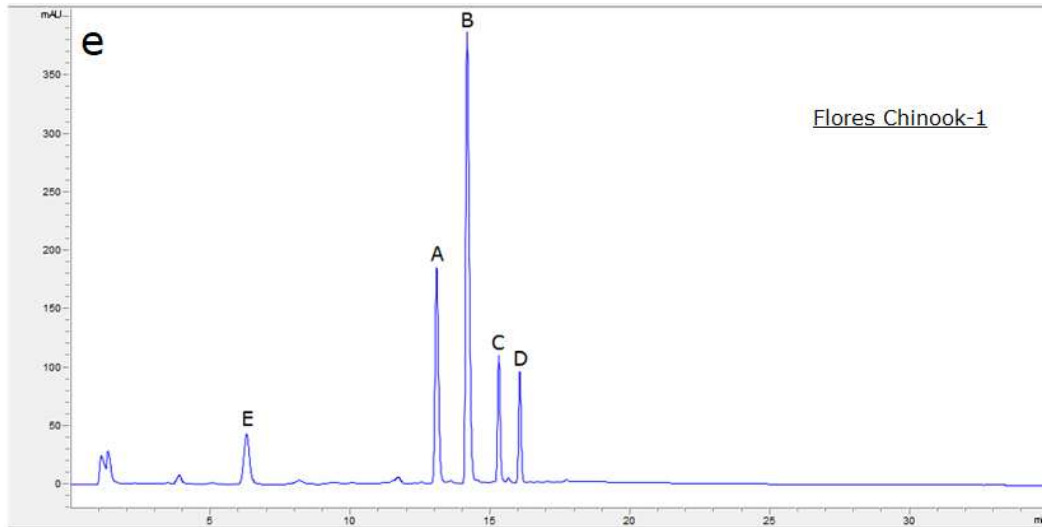
A figura 26 apresenta os cromatogramas obtidos para as soluções (26a e 26b) utilizadas na construção das curvas padrão de calibração (ICE-4 e xanthohumol), além dos extratos obtidos por extração QuEChERS das amostras de pellets e cones de lúpulo analisadas neste trabalho (26c – 26g). É possível observar que o método cromatográfico aplicado permitiu a separação e identificação satisfatória dos compostos de interesse, considerando os comprimentos de onda avaliados.

Os ácidos amargos: (A) cohumulona - α_1 , (B) humulona coeluida com adhumulona - α_2 , (C) colupulona - β_1 e (D) lupulona coeluida com adlupulona - β_2 , aparecem com picos de elevada intensidade no padrão ICE-4 e em todas as amostras de lúpulo analisadas, com tempos de retenção compreendidos entre 13 - 16 min. Observa-se o mesmo perfil para o xanthohumol, porém com tempo de retenção inferior (≈ 6 min) aos ácidos amargos, devido sua maior polaridade. Desta forma os cromatogramas evidenciam um perfil químico muito característico e similar em todas as amostras analisadas, independente do seu formato (pellets ou cones), demonstrando que os ácidos amargos e o xanthohumol são os constituintes majoritários nesta parte da planta, principalmente ao atingirem o tempo de maturação, corroborando com dados relatados por Marques et al. (2022). Também são observados picos em diferentes tempos de retenção de espécies que não foram objeto de análise.

Figura 26 – Cromatogramas dos padrões e extratos do lúpulo: (a) padrão de ácidos amargos ICE-4, (b) padrão xanthohumol, (c) pellet Herkules, (d) pellet Saaz, (e) cones Chinook-1, (f) cones Chinook-2, (g) cones Cascade.







Fonte: Autor (2023).

A tabela 3, apresenta os dados estatísticos/analíticos obtidos para as curvas padrão e os resultados quantitativos ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$) para os ácidos amargos e xanthohumol nas diferentes amostras analisadas por cromatografia líquida. Os dados estão expressos na forma das médias aritméticas das três extrações realizadas com cada amostra ($n = 3$) com seus respectivos valores de desvio padrão relativo (RSD%).

A cultivar Herkules é conhecida por apresentar altos teores de α -ácidos, muito utilizadas em receitas cervejeiras de elevado amargor, propriedade expressa em IBU (International Bitterness Units). Os pellets comerciais analisados desta variedade apresentaram α_{total} ($\alpha_1 + \alpha_2$) e β_{total} ($\beta_1 + \beta_2$) iguais a 8,855 e 1,895 $\text{g } 100\text{g}^{-1}$, respectivamente, correspondendo a cerca de 70% dos valores de referência indicados no rótulo. Entre todas as variedades estudadas, esta foi a que apresentou o maior valor de ácidos amargos totais ($\alpha_{\text{total}} + \beta_{\text{total}} = 10,750 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$). A proporção de cohumulona ($\alpha_1/\alpha_{\text{total}}$) observada (31,73%) corrobora com o indicado pelo fabricante, sendo a concentração de xanthohumol verificada, muito expressiva para esta cultivar (2,165 $\text{g } 100\text{g}^{-1}$) e coaduna com o indicativo de aproximadamente 5% de compostos fenólicos do rótulo.

Nos pellets da variedade Saaz, os quantitativos de α_{total} e β_{total} (1,847 e 2,245 $\text{g } 100\text{g}^{-1}$) corresponderam a praticamente 80% dos valores de referência do fabricante. O percentual de cohumulona ($\alpha_1/\alpha_{\text{total}}$), foi de 36,54%, superior a faixa de referência para esta variedade (23-28%) e o teor de xanthohumol foi o menor entre todas as amostras (0,010 $\text{g } 100\text{g}^{-1}$) avaliadas. Os pellets (Herkules e Saaz) já possuíam mais de dois anos de estocagem até período das análises (Safrá 2021), indicando boa estabilidade dos compostos de interesse nas condições de armazenamento.

Nos extratos dos cones da variedade Chinook-1 (Brasília - Brasil), obtidas de plantas com maior estado de maturação, a concentração de α_{total} (6,414 $\text{g } 100\text{g}^{-1}$) verificada correspondeu a mais da metade do esperado para uma planta madura desta cultivar, após mais de 1 ano de estocagem, indicando boa adaptação a região de plantio. É notória a baixa concentração de β -ácidos ($\beta_{\text{total}} = 0,236 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$) em relação aos teores α_{total} para esta amostra, sendo o percentual de cohumulona identificado (21,20%), levemente inferior ao esperado para esta cultivar. Esta amostra foi a que apresentou os maiores quantitativos de xanthohumol (2,402 $\text{g } 100\text{g}^{-1}$) entre todas as amostras avaliadas, demonstrando ser esta variedade uma boa fonte para obtenção deste bioativo de elevado valor comercial em sua forma pura.

O extrato dos cones de Chinook-2, obtidos de plantas de primeira floração em outra região no Brasil (Monte Alegre – RN), apresentou os compostos de interesse, porém os valores de α_{total} (1,290 $\text{g } 100\text{g}^{-1}$) e β_{total} (0,730 $\text{g } 100\text{g}^{-1}$) foram muito inferiores ao relatado

para esta cultivar. Os valores de xanthohumol se mostraram mais significativos ($0,432 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$), indicando que as plantas ainda estão em processo de adaptação à região de plantio. Os cones da variedade Cascade apresentaram o menor valor de α_{total} ($0,713 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$) em relação a todas as amostras, e baixos índices de β_{total} ($0,311 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$) e xanthohumol ($0,083 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$).

Portanto, os resultados demonstram que a variedade Herkules e Chinook-1, apresentaram os resultados mais expressivos em relação aos teores de ácidos amargos e de xanthohumol.

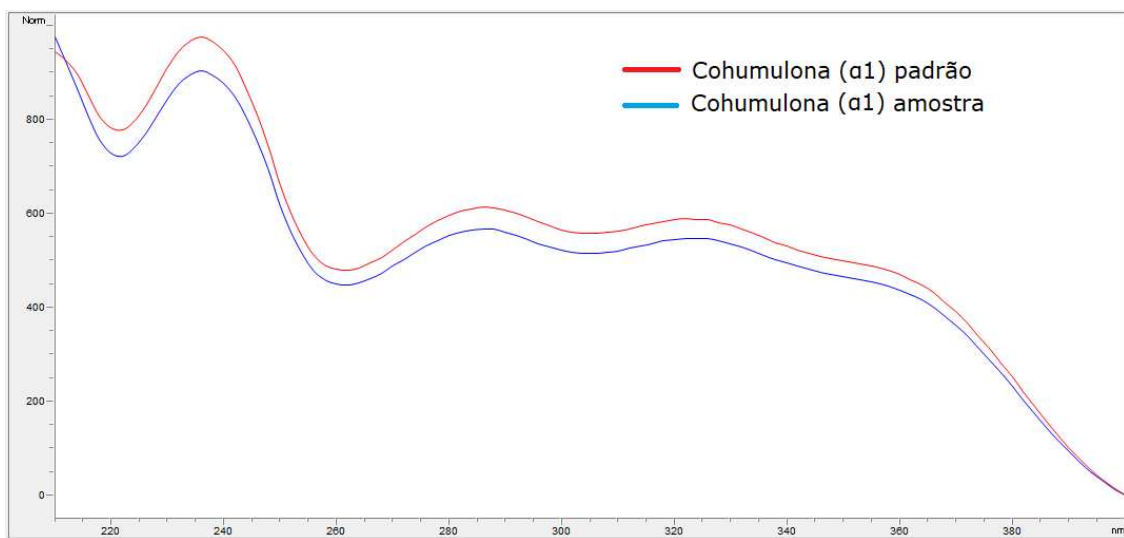
Tabela 3 – Dados analíticos/estatísticos das curvas padrão e quantificação em g 100g⁻¹ dos ácidos amargos (α e β) e xanthohumol presentes nas flores, utilizando extração QuEChERS e cromatografia líquida de alta performance (CLAE-DAD).

Composto	λ (nm)	$t_R \approx$ (min)	Faixa da curva padrão (mg mL ⁻¹) n = 7	Equações da curva padrão	R ²	Pellets comerciais g 100g ⁻¹		Lúpulo estabilizado g 100g ⁻¹	Floração inicial g 100g ⁻¹	
						Saaz n = 3 (%RSD)	Herkules n = 3 (%RSD)	Chinook-1 n = 3 (%RSD)	Chinook-2 n = 3 (%RSD)	Cascade n = 3 (%RSD)
Xanthohumol (XN)	340	5,7	0,006 – 0,18 (n=6)	y = 44,97 x – 67,39	0,999	0,010 (12,86)	2,165 (4,90)	2,402 (5,51)	0,432 (16,98)	0,083 (13,57)
Cohumulona (α_1)	326	12,8	0,027 – 0,432	y = 10.533 x – 4,4493	0,991	0,675 (3,14)	2,810 (4,03)	1,360 (11,57)	0,345 (10,25)	0,327 (15,23)
Humulona + Adhumulona (α_2)	326	14,1	0,079 – 1,264	y = 10.669 x – 79,51	0,997	1,172 (6,04)	6,045 (1,29)	5,054 (17,31)	0,945 (20,20)	0,386 (18,76)
Colupulona (β_1)	326	15,2	0,032 – 0,576	y = 7.785 x – 88,62	0,996	1,260 (7,86)	0,955 (21,47)	0,144 (9,43)	0,355 (17,92)	0,145 (13,54)
Lupulona + Adlupulona (β_2)	326	16,0	0,034 – 0,538	y = 10.159 x – 40,358	0,993	0,985 (7,90)	0,940 (16,55)	0,092 (8,99)	0,375 (14,51)	0,166 (14,99)
Total						4,102	12,915	9,052	2,452	1,107

Fonte: Autor (2023).

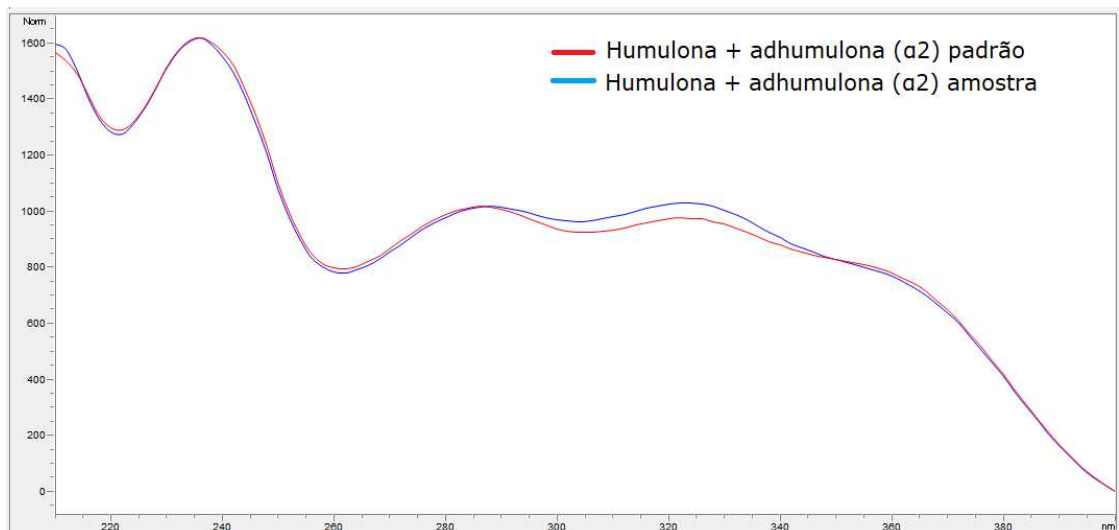
As figuras a seguir ilustram os espectros ultravioleta (UV) no comprimento de onda de 326 nm para os ácidos amargos, e 340 nm para o xanthohumol, os quais foram comparados com espectros UV dos padrões ICE-4, para identificação dos α e β -ácidos, e do xanthohumol. A comparação foi realizada após cadastro dos padrões na biblioteca espectral do cromatógrafo líquido e confirma a presença dessas substâncias nas amostras analisadas.

Figura 27 – Comparação entre os espectros UV de cohumulona padrão e de um extrato de lúpulo analisados nesta pesquisa.



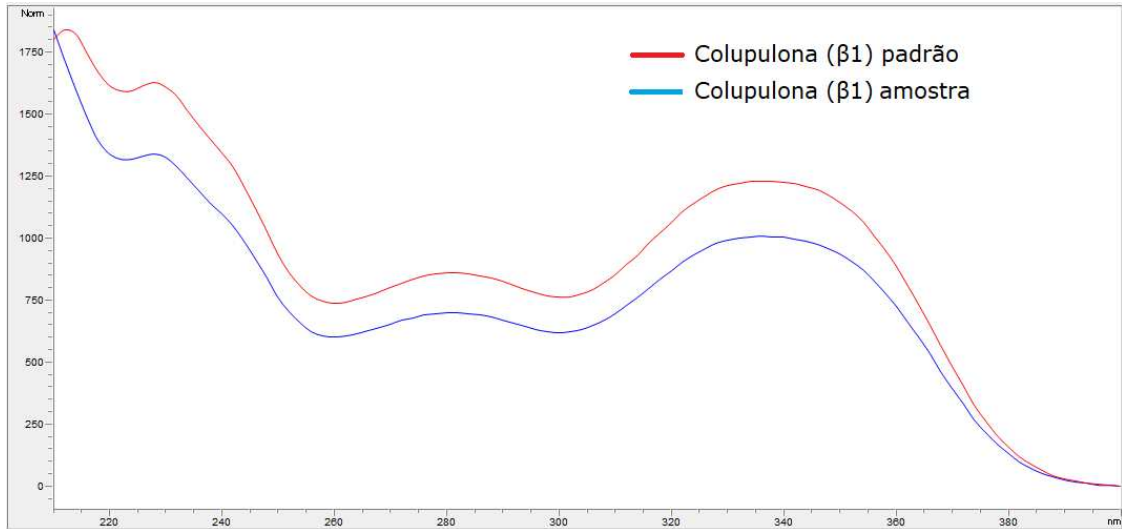
Fonte: Autor (2023).

Figura 28 – Comparação entre os espectros UV de humulona + adhumulona padrão e de um extrato de lúpulo analisados nesta pesquisa.



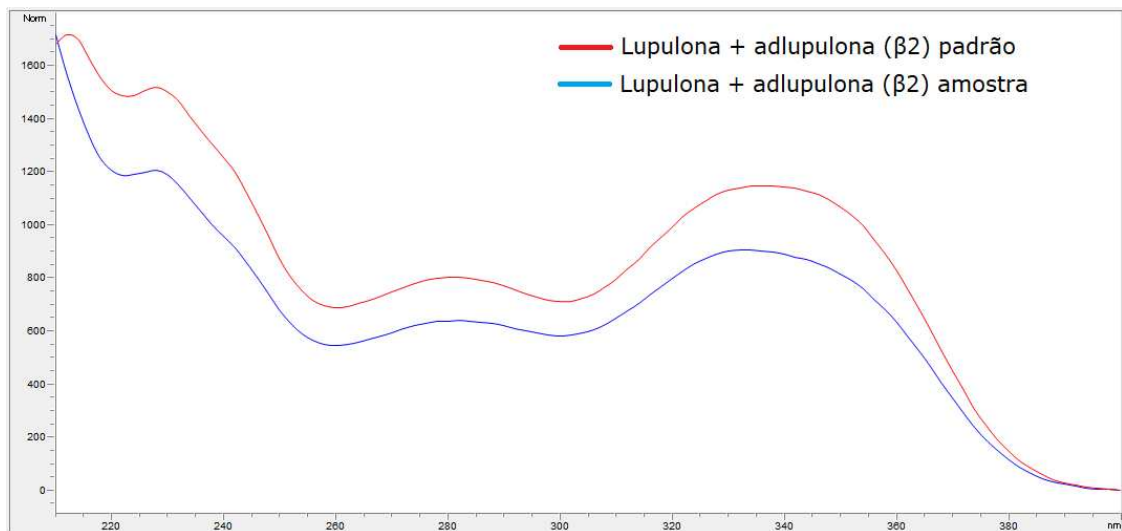
Fonte: Autor (2023).

Figura 29 – Comparação entre os espectros UV de colupulona padrão e de um extrato de lúpulo analisados nesta pesquisa.



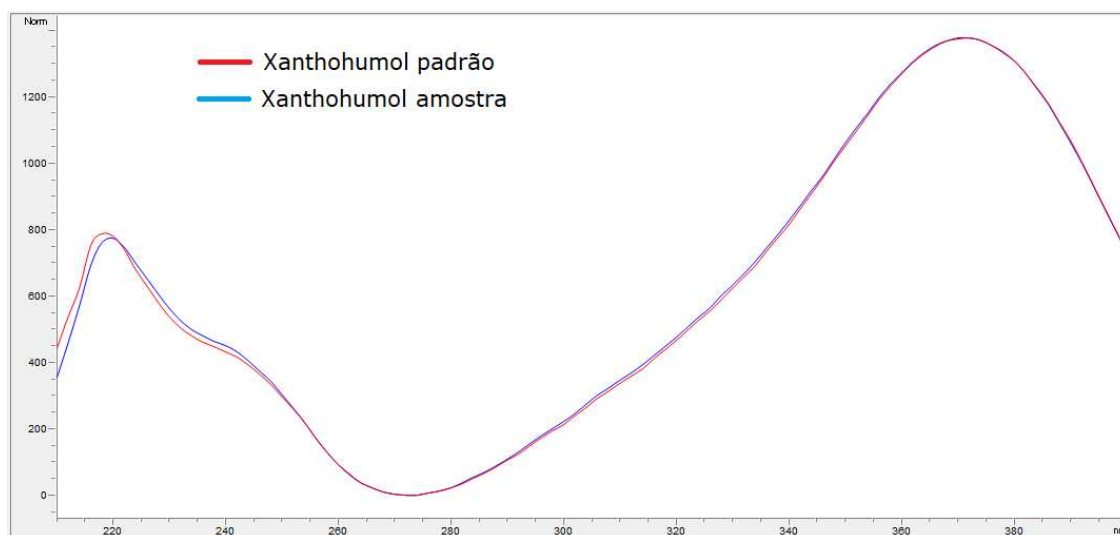
Fonte: Autor (2023).

Figura 30 – Comparação entre os espectros UV de lupulona + adlupulona padrão e de um extrato de lúpulo analisado nesta pesquisa.



Fonte: Autor (2023).

Figura 31 – Comparação entre os espectros UV de xanthohumol padrão e de um extrato de lúpulo analisados nesta pesquisa.



Fonte: Autor (2023).

5.2 Teor de Fenólicos Totais (TFT) e ensaios antioxidantes (DPPH[•] e ABTS^{•+})

Os resultados de determinação do teor de fenólicos totais realizados segundo o método de F-C para os extratos em metanol estão apresentados na tabela 4, sendo os dados expressos em mg de equivalente de ácido gálico (EAG) g⁻¹ de extrato. Também estão apresentados os valores de IC₅₀ para as diferentes amostras analisadas nos ensaios antioxidantes de inibição dos radicais DPPH[•] e ABTS^{•+}.

Tabela 4 – Dados analíticos/estatísticos dos teores de fenólicos totais e de análise antioxidante dos extratos e padrões.

Amostras	Fenólicos totais (mg EAG g ⁻¹) Extratos em metanol (RSD%)	DPPH* - IC ₅₀ (µg mL ⁻¹) EM / EH (RSD%)		ABTS ⁺⁺ - IC ₅₀ (µg mL ⁻¹) EM / EH (RSD%)	
(I) Pellets comerciais					
	EM	EM	EH	EM	EH
Saaz	53,569 (1,353)	446,14 (11,749)	2.225,621 (10,547)	343,186 (6,294)	1.056,956 (11,522)
Herkules	45,505 (5,261)	578,206 (5,175)	317,263 (8,448)	272,502 (16,94)	187,087 (19,848)
(II) Cones cultivados no Brasil					
	EM	EM	EH	EM	EH
Chinook-1	47,591 (12,530)	531,961 (14,447)	523,31 (7,291)	289,239 (7,740)	215,298 (6,703)
Chinook-2	51,360 (10,603)	361,429 (0,777)	1.048,631 (3,314)	307,488 (15,699)	637,697 (1,175)
Cascade	22,703 (8,210)	1.977,854 (7,721)	*	923,808 (2,741)	*
(III) Padrões					
ICE – 4	-	171,464 (9,556)		144,565 (5,865)	
Xanthohumol	-	*		51,338 (13,254)	
BHT	-	114,797 (17,542)		65,216 (10,096)	

* Capacidade inibitória inferior a 50%.

Fonte: Autor (2023).

Com exceção do lúpulo Cascade (22,703 mg EAG g⁻¹), todos os extratos em metanol analisados apresentaram significativos valores de fenólicos totais, com maior

quantitativo para as variedades Saaz (53,569 mg EAG g⁻¹), Chinook-2 (51,360 mg EAG g⁻¹), seguido de Chinook-1 (47,591 mg EAG g⁻¹) e Herkules (45,505 mg EAG g⁻¹). Nota-se que os dois primeiros extratos com maiores teores de fenólicos não apresentam os maiores teores de xanthohumol conforme apresenta a tabela 3, indicando que nessas espécies é ampla a variedade de compostos fenólicos que não foram o estudo alvo desta pesquisa.

A análise da capacidade antioxidante de inativação do radical DPPH[•] evidenciou que as espécies com os maiores valores de TFT apresentaram também as melhores atividades antioxidantes, com destaque para os extratos em metanol Chinook-2 e Saaz, que obtiveram valores de IC₅₀ iguais a 361,429 e 446,140 µg mL⁻¹. Devido ao maior valor de fenóis totais em sua composição química, o extrato em metanol da cultivar Chinook-1 (IC₅₀ = 531,961 µg mL⁻¹) foi mais expressivo neste método do que o extrato em metanol Herkules (IC₅₀ = 578,206 µg mL⁻¹). O extrato em metanol Cascade apresentou a pior ação antioxidante dentre os extratos em metanol, corroborando para o menor valor de quantificação dos fenólicos pelo método de F-C.

Conforme apresenta a tabela 4, o padrão xanthohumol não apresentou capacidade inibitória de 50% do radical e, por tanto, tem sua ação enfraquecida neste método. Porém, extratos com elevado teores dessa substância apresentaram boas ações de sequestro do radical DPPH[•], evidenciando que o sinergismo entre os compostos fenólicos em um extrato de lúpulo beneficia suas ações antioxidantes.

Dentre os extratos em hexano, o destaque foi o lúpulo Herkules (IC₅₀ = 317,263 µg mL⁻¹), seguido das cultivares Chinook-1 (IC₅₀ = 523,310 µg mL⁻¹), Chinook-2 (IC₅₀ = 1.048,631 µg mL⁻¹) e Saaz (IC₅₀ = 2.225,621 µg mL⁻¹). Esses resultados evidenciam que o elevado teor de ácidos amargos presentes na composição química de um extrato confere a amostra significativa ação antioxidante. Essa justificativa é elucidada analisando a atividade antioxidante do padrão ICE-4, que apresentou a mais promissora ação quando comparados com os extratos e xanthohumol, com valor de IC₅₀ = 171,464 µg mL⁻¹, próximo ao controle positivo do ensaio, o antioxidante comercial BHT (IC₅₀ = 114,797 µg mL⁻¹). Devido ao baixo valor de ácidos amargos em sua composição química, o extrato em hexano Cascade não apresentou capacidade de inibição próxima a 50% do radical DPPH[•].

As amostras de lúpulo apresentaram também ação inibitória frente ao método ABTS^{•+}, no qual os dois extratos em metanol que apresentaram os maiores teores de xanthohumol em sua composição química, Herkules (2,165 g 100g⁻¹) e Chinook-1 (2,402 g 100g⁻¹), apresentaram também as melhores capacidades antioxidantes (IC₅₀ = 272,502 e 289,239 µg mL⁻¹ respectivamente). Este resultado corrobora com a análise do padrão

xanthohumol, que apesar de não demonstrar significativa ação em relação ao ensaio DPPH[•], apresentou a melhor capacidade antioxidante de estabilização do radical ABTS^{•+} (IC₅₀ = 51,338 µg mL⁻¹), superior ao controle positivo BHT (65,216 µg mL⁻¹).

Os extratos em metanol Chinook-2, Saaz e Cascade também apresentaram ação antioxidante neste método, com valores de IC₅₀ iguais a 307,488, 343,186 e 923,808 µg mL⁻¹. Além disso, é importante destacar que para os extratos em metanol, todos os dados referentes ao ensaio antioxidante ABTS^{•+} foram mais efetivos quando comparados com o método DPPH[•], evidenciando a significativa contribuição do xanthohumol no combate ao radical.

A análise da ação dos ácidos amargos como resposta inibitória do radical ABTS^{•+} também foi determinada, evidenciando uma elevada atividade antioxidante para os extratos com os maiores teores de ácidos amargos, Herkules (10,750 g 100g⁻¹) e Chinook-1 (6,65 g 100g⁻¹), apresentando valores de IC₅₀ iguais a 187,087 e 215,298 µg mL⁻¹, respectivamente. Esses resultados evidenciam a elevada ação de estabilização do radical ABTS^{•+} pelo padrão de ácidos amargos ICE-4 (IC₅₀ = 144,565 µg mL⁻¹). Apesar da maior atividade do extrato Herkules, a variedade Chinook-1 apresentou elevada capacidade antioxidante apesar da diferença de concentração de ácidos amargos em sua composição, corroborando para a existência de outros compostos químicos atuando em sinergismo com os ácidos amargos. Isso exemplifica a melhor atividade antioxidante neste método da cultivar Chinook-2 (IC₅₀ = 637,697 µg mL⁻¹), com teor de ácidos amargos iguais a 2,02 g 100g⁻¹, quando comparado com extrato em hexano Saaz (IC₅₀ = 1.056,956 µg mL⁻¹), que apresenta um maior teor de ácidos amargos (4,092 g 100g⁻¹). O extrato em hexano Cascade não apresentou atividade inibitória de 50% neste ensaio, corroborando com os baixos valores de $\alpha_{\text{total}} + \beta_{\text{total}}$ em sua composição (1,024 g 100g⁻¹).

Por tanto, todos os extratos, com exceção dos extratos em hexano da variedade Cascade, avaliados apresentaram ação antioxidante, independente do ensaio, o que está de acordo com relatos da literatura para outras variedades de lúpulo (WU et al., 2020; KESKIN et al., 2019).

5.3 Análises de captura do radical hidroxila e inibição das enzimas xantina oxidase, α -glicosidase e acetilcolinesterase

Os ensaios de captura dos radicais hidroxila e de inibição das enzimas xantina oxidase, α -glicosidase e acetilcolinesterase foram realizados para as amostras mais ativas nos ensaios DPPH[•] e ABTS^{•+}, para demonstração da significativa ação dos extratos e dos padrões ICE-4 e xanthohumol em outros sistemas antioxidantes e de inibição enzimática, conforme apresenta a tabela 5.

Tabela 5 – Dados analíticos obtidos a partir das análises de inibição enzimática.

Ensaio de inibição								
Amostras	Radical hidroxila n = 2 IC ₅₀ – µg mL ⁻¹ (RSD%)		Ácido úrico n = 2 IC ₅₀ – µg mL ⁻¹ (RSD%)		α-glicosidase n = 3 IC ₅₀ – µg mL ⁻¹ (RSD%)		Acetilcolinesterase (mm)	
(I) Pellets comerciais e cones cultivados no Brasil								
	EM	EH	EM	EH	EM	EH	EM	EH
Herkules	1.494,345 (5,694)	2.276,029 (21,696)	2.446,075 (2,347)	*	239,344 (6,100)	177,182 (2,729)	**	9
Saaz	*	*	*	*	90,990 (12,430)	313,816 (12,840)	**	7
Chinook-1	2.889,708 (2,718)	2.457,315 (2,115)	2.437,772 (4,222)	*	35,339 (3,873)	127,091 (3,662)	**	8
(II) Padrões								
ICE-4	2.957,723		5.213,415 (4,006)		183,081 (2,934)		6	
Xanthohumol	225,241 (7,802)		*		13,184 (10,047)		**	
Mangiferina	711,433		521,804		-		-	
Acarbose	-		-		370,540 (2,871)		-	
Eserina	-		-		-		9	

*Capacidade inibitória inferior a 50%.

**Não foi observada a formação de halo branco no ensaio de inibição da acetilcolinesterase.

Fonte: Autor (2023).

As análises da capacidade de sequestro dos radicais hidroxila evidenciaram novamente à ação antioxidante dos extratos, nos quais as amostras com os maiores quantitativos de ácidos amargos e xanthohumol (Herkules – IC₅₀ = 1.494,345 µg mL⁻¹ e

Chinook-1 – $IC_{50} = 2.889,708 \mu\text{g mL}^{-1}$), se mostraram as mais eficientes, principalmente os extratos em metanol (EM). Os extratos em hexano Herkules e Chinook-1 ($IC_{50} = 2.276,029$ e $2.457,315 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente) apresentaram melhor efetividade de inibição que o padrão de ácidos amargos ICE-4 ($IC_{50} = 2.957,723 \mu\text{g mL}^{-1}$), demonstrando novamente a ação antioxidante dos ácidos amargos, porém, todos com valores de IC_{50} superiores ao padrão positivo mangiferina ($711,433 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Já o resultado para o xanthohumol ($225,241 \mu\text{g mL}^{-1}$) se mostrou aproximadamente 3 vezes menor que o da mangiferina, o que demonstra a elevada capacidade desta substância em combater os radicais hidroxila e, conseqüentemente, o estresse oxidativo. Desta forma fica evidenciada a relação entre os altos teores de xanthohumol e ácidos amargos observados para as cultivares Herkules e Chinook-1 (tabela 3) e a ação mais efetiva nos ensaios antioxidantes.

A variedade Saaz foi menos efetiva, apresentando valores de percentuais de inibição iguais a $47,374 \pm 1,634$ e $30,501 \pm 1,935 \%$ para os extratos em hexano e em metanol, respectivamente.

A atividade de inibição da enzima xantina oxidase, visando combater a formação de ácido úrico, foi verificada de forma significativa apenas nos extratos em metanol das variedades Chinook-1 ($IC_{50} = 2.437,772 \mu\text{g mL}^{-1}$) e Herkules ($IC_{50} = 2.446,075 \mu\text{g mL}^{-1}$) com valores de IC_{50} superiores ao padrão mangiferina ($IC_{50} = 521,804 \mu\text{g mL}^{-1}$). Dentre os extratos em hexano, a variedade Chinook-1 apresentou inibição média igual a $40,268 \pm 11,401\%$, evidenciando inibição próxima de 50% em sua maior concentração na solução-tampão. O padrão ICE-4 confirmou a inibição da enzima xantina oxidase pela ação dos ácidos amargos, com IC_{50} igual a $5.213,415 \mu\text{g mL}^{-1}$.

O xanthohumol apresentou inibição máxima de formação de ácido úrico igual a $43,933 \pm 5,109 \%$, não sendo possível a determinação de seu valor de IC_{50} por não atingir o patamar de 50%. Porém, é importante salientar que no procedimento experimental a concentração inicial de xanthohumol era de $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$, diferente de todas as amostras nas quais foram utilizadas concentrações iguais a $10.000 \mu\text{g mL}^{-1}$, o que permite inferir que o valor de IC_{50} para este padrão deve ser próximo da máxima concentração em solução-tampão no sistema hipoxantina/xantina oxidase analisada, $490,196 \mu\text{g mL}^{-1}$. Isso permite evidenciar que o xanthohumol mesmo em concentrações baixas consegue apresentar uma significativa capacidade inibitória de formação de ácido úrico.

Os ensaios de inibição da enzima α -glicosidase demonstraram a expressiva atividade antidiabética dos constituintes químicos do lúpulo, já que todos os extratos das

diferentes variedades avaliadas, apresentarem inibição enzimática superior ao medicamento acarbose, utilizado como controle positivo ($IC_{50} = 370,540 \mu\text{g mL}^{-1}$). Entre os extratos em hexano, as amostras com os maiores teores de ácidos amargos (Herkules e Chinook-1) se mostraram como as mais eficazes ($IC_{50} = 177,182$ e $127,091 \mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente). O padrão de ácidos amargos ICE-4, apresentou valor de IC_{50} aproximadamente 2 vezes mais efetivo do que o fármaco de referência, o que comprova mais uma vez a ação efetiva do sinergismo entre humulonas e lupulonas em inibir a enzima α -glicosidase, indicando promissora ação dos extratos do lúpulo para o tratamento de diabetes do tipo 2 e corrobora com dados da literatura que utilizou padrões puros destas substâncias (WANG et al., 2022).

O xanthohumol apresentou a melhor ação de inibição da enzima α -glicosidase dentre todas as amostras ($IC_{50} = 13,184 \mu\text{g mL}^{-1}$) analisadas, demonstrando ótima viabilidade desta espécie química para atuar como princípio ativo na constituição de medicamentos contra a diabetes do tipo 2. Por ser o constituinte polifenólico majoritário das amostras analisadas, contribuiu para a elevada atividade antihiperclêmica observada nos extratos em metanol (IC_{50} entre $35,339$ e $239,344 \mu\text{g mL}^{-1}$). Além disso, apesar do baixo teor de xanthohumol em sua composição química, o extrato em metanol Saaz apresentou significativo valor de IC_{50} quando comparado com o controle positivo acarbose, confirmando a relação entre o elevado teor de fenólicos totais, determinados pelo método de F-C, e a promissora ação inibitória da enzima α -glicosidase. Logo, o sinergismo de compostos fenólicos presentes em sua constituição química foi essencial para observação da significativa ação inibitória.

Segundo Wang et al. (2022), prenilflavonoides e ácidos amargos apresentam ação de inibição da enzima α -glicosidase, baseado em ensaios de docagem molecular e *in vitro* com padrões de compostos observados em extratos do lúpulo. Neste trabalho foi evidenciado que a interação molecular existente entre o fármaco acarbose ($IC_{50} = 58 \pm 3,7 \mu\text{M}$) e a enzima α -glicosidase ocorre através de sítios de ligação com os resíduos da enzima, ou seja, com aminoácidos presentes na estrutura da enzima α -glicosidase (WANG et al., 2022).

Este trabalho também expõe que um padrão amplamente abundante no lúpulo, o xanthohumol ($IC_{50} = 47 \pm 1,2 \mu\text{M}$), também apresenta ação de inibição da enzima α -glicosidase, confirmando o caráter antidiabético dos extratos em metanol dos pellets comerciais e de flores cultivadas no Brasil (WANG et al., 2022).

Tratando-se dos extratos em hexano e do ICE-4, tendo como base de análise os compostos presentes na constituição químicos dos extratos, observam-se compostos estes que não apresentam fenóis em sua estrutura, indicando existir um mecanismo distinto para que ocorra inibição da enzima α -glicosidase, e possível ação antidiabética desses extratos.

Conforme apresentado por Wang et al. (2022), tendo como análise a humulona e a lupulona ($IC_{50} = 66 \pm 2,7 \mu M$ e $50 \pm 1,9 \mu M$, respectivamente), um α -ácido e um β -ácido abundantes em cones de lúpulo, foram observadas ações inibitórias da enzima α -glicosidase. E o estudo de docagem molecular permitiu observar a existência de interações da lupulona com resíduos de aminoácidos da enzima. Isso corrobora para a observação atestada neste trabalho, observando-se resultado positivo para inibição da enzima pelos extratos em hexano e padrão ICE-4.

Os testes de inibição da enzima acetilcolinesterase permitiu verificar que os extratos em hexano do lúpulo e o ICE-4 atuaram como bons inibidores, apresentando tamanhos de halo variando de 6 a 9 mm de diâmetro. O extrato em hexano Herkules apresentou formação de halo com tamanho similar ao padrão eserina (9 mm), indicando significativa ação anticolinesterásica e demonstrando que os ácidos amargos são substâncias promissoras para o aumento dos níveis de acetilcolina no cérebro. Os extratos em metanol não apresentaram capacidade inibitória na concentração testada.

6 CONCLUSÃO

O pellet comercial Herkules apresentou o maior teor de α_{total} e β_{total} , iguais a 8,855 e 1,895 ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$), seguido da cultivar Chinook-1 com concentração de α e β -ácidos iguais a 6,414 e 0,236 $\text{g } 100\text{g}^{-1}$, respectivamente. Essas duas variedades também apresentaram os maiores percentuais de xanthohumol em suas composições, com valores iguais a 2,402 e 2,165 $\text{g } 100\text{g}^{-1}$ para as amostras Chinook-1 e Herkules.

Os ensaios de determinação do teor de fenólicos totais apresentaram relação direta com a capacidade antioxidante, conforme foi evidenciado para os extratos Chinook-2 e Saaz, que apresentaram as melhores capacidades antioxidante no método DPPH \cdot . Os extratos em hexano foram mais ativos neste método antioxidante quanto maior o teor de ácidos amargos.

O ensaio de inibição do radical ABTS $^{\bullet+}$ evidenciou que o elevado teor de xanthohumol foi predominante para uma maior ação dentre os extratos em metanol, com destaque para os extratos Herkules e Chinook-1. Similarmente foi observado para o teor de ácidos amargos, no qual os extratos em hexano das variedades Herkules e Chinook-1 apresentaram as melhores atividades antioxidante neste método. O padrão ICE-4 apresentou significativa ação inibitória, e o xanthohumol foi a amostra com a melhor capacidade antioxidante, superando o controle positivo BHT.

Os extratos com maiores teores de xanthohumol, Herkules e Chinook-1, foram os mais ativos contra o radical hidroxila, corroborando com a efetiva ação do xanthohumol neste método. Os extratos em hexano das variedades Herkules e Chinook-1 foram mais ativos que o padrão ICE-4 neste ensaio.

Apenas os extratos em metanol, Herkules e Chinook-1 apresentaram capacidade inibitória da enzima xantina oxidase, corroborando com o valor percentual de inibição da formação de ácido úrico pelo padrão xanthohumol ($43,933 \pm 5,109 \%$). A inibição de formação de ácido úrico pela ação dos ácidos amargos foi confirmada com o ICE-4.

Os ensaios de inibição da enzima α -glicosidase demonstraram que todos os extratos foram mais efetivos que o controle positivo acarbose, evidenciando elevada capacidade antihiperlicêmica das amostras analisadas.

A inibição da enzima acetilcolinesterase só foi verificada nos extratos com altos valores de ácidos amargos (em hexano), apresentando ação terapêutica similar a eserina.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, G.; AL-HARRASI, A. S.; HUSSAIN, H. α -Glucosidase Enzyme Inhibitors from Natural Products. *In: BRAHMACHARI, G. **Discovery and Development of Antidiabetic Agents from Natural Products**: natural product drug discovery.* Amsterdã: Elsevier, 2017. p. 251-269.
- ABIKO, Y.; PAUDEL, D.; UEHARA, O. Hops components and oral health. **Journal of Functional Foods**, Amsterdã, v. 92, n. 105035, p. 1-7, 2022.
- AL-ISHAQ, R. K.; ABOTALEB, M.; KUBATKA, P.; KAJO, K.; BÜSSELBERG, D. Flavonoids and Their Anti-Diabetic Effects: cellular mechanisms and effects to improve blood sugar levels. **Biomolecules**, Basileia, v. 9, n. 9, p. 1-35, 2019.
- ALMAGUER, C.; SCHÖNBERGER, C.; GASTL, M.; ARENDT, E. K.; BECKER, T. Humulus lupulus- a story that begs to be told. A review. **Journal of the Institute of Brewing**, Hoboken, v. 120, n. 4, p. 289-314, 2014.
- AZEVEDO, V. F.; LOPES, M. P.; CATHOLINO, N. M.; PAIVA, E. dos S; ARAÚJO, V. A.; PINHEIRO, G. da R. C. Revisão crítica do tratamento medicamentoso da gota no Brasil. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v. 57, n. 4, p. 346-355, 2017.
- BAMFORTH, W. C. **Beer: tap into the art and science of brewing.** 2. ed. New York: Oxford University Press, 2003.
- BARDIN, T.; RICHETTE, P. Definition of hyperuricemia and gouty conditions. **Current Opinion in Rheumatology**, Estados Unidos da América, v. 26, n. 2, p. 186-191, 2014.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BAXTER, E. D. HUGHES, P. S.; **Beer: quality, safety and nutritional aspects.** 1. ed. Cambridge: RSC Paperbacks, 2001.
- BOCQUET, L.; SAHPAZ, S.; HILBERT, J. L.; RAMBAUD, C.; RIVIÈRE, C. Humulus lupulus L., a very popular beer ingredient and medicinal plant: overview of its phytochemistry, its bioactivity, and its biotechnology. **Phytochemistry Reviews**, Berlim, v. 17, n. 5, p. 1047-1090, 2018.
- BOLTON, J. L.; DUNLAP, T. L.; HAJIRAHIMKHAN, A.; MBACHU, O.; CHEN, Shao-Nong; CHADWICK, L.; NIKOLIC, D.; VAN BREEMEN, R. B.; PAULI, G. F.; DIETZ, B. M. The Multiple Biological Targets of Hops and Bioactive Compounds. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v. 32, n. 2, p. 222-233, 2019.
- BORGHI, C.; BENTIVENGA, C.; COSENTINO, E. R. Uric acid and risk of myocardial infarction. A dynamic duo. **International Journal of Cardiology**, Amsterdã, v. 320, p. 23-24, 2020.

BURNS, A.; ILIFFE, S. Alzheimer's disease. **Bmj**, Londres, v. 338, p. 467-471, 2009.

CERMAK, P.; OLISOVSKA, J.; MIKYSKA, A.; DUSEK, M.; KADLECKOVA, Z.; VANICEK, J.; NYC, O.; SIGLER, K.; BOSTIKOVA, V.; BOSTIK, P. Strong antimicrobial activity of xanthohumol and other derivatives from hops (*Humulus lupulus* L.) on gut anaerobic bacteria. **Apmis**, Hoboken, v. 125, n. 11, p. 1033-1038, 2017.

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G. de; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 441-449, 2007.

CICCO, N.; LANORTE, M. T.; PARAGGIO, M.; VIGGIANO, M.; LATTANZIO, V. A reproducible, rapid and inexpensive Folin–Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. **Microchemical Journal**, Amsterdã, v. 91, n. 1, p. 107-110, 2009.

COLLIN, F. Chemical Basis of Reactive Oxygen Species Reactivity and Involvement in Neurodegenerative Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, Basileia, v. 20, n. 10, p. 2407, p. 1-17, 2019.

COLLINS, Y.; CHOUCANI, E. T.; JAMES, A. M.; MENGER, K. E.; COCHEMÉ, H. M.; MURPHY, M. P. Mitochondrial redox signalling at a glance. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 125, n. 4, p. 801-806, 2012.

CUI, F.; XI, L.; ZHAO, G.; WANG, D.; TAN, X.; LI, J.; LI, T. Screening of xanthine oxidase inhibitory peptides by ligand fishing and molecular docking technology. **Food Bioscience**, Amsterdã, v. 50, n. 102152, p. 1-11, 2022.

DURELLO, R.; SILVA, L.; BOGUSZ JUNIOR, S. Química do lúpulo. **Química Nova**, São Paulo, v. 42, n. 8, p. 900-919, 2019.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, Amsterdã, v. 7, n. 2, p. 88-95, 1961.

FENG, Y.; NAN, H.; ZHOU, H.; XI, P.; LI, B. Mechanism of inhibition of α -glucosidase activity by bavachalcone. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 42, n. 123421, p. 1-6, 2022.

FERREIRA, M. K. A.; FONTENELLE, R. O. S.; MAGALHÃES, F. E. A.; BANDEIRA, P. N.; MENEZES, J. E. S. A. de; SANTOS, H. S. dos. Chalcones pharmacological potential: a brief review. **Revista Virtual de Química**, Niterói, v. 10, n. 5, p. 1455-1473, 2018.

FERRI, C. P.; PRINCE, M.; BRAYNE, C.; BRODATY, H.; FRATIGLIONI, L.; GANGULI, M.; HALL, K.; HASEGAWA, K.; HENDRIE, H.; HUANG, Y. Global prevalence of dementia: a delphi consensus study. **The Lancet**, Amsterdã, v. 366, n. 9503, p. 2112-2117, 2005.

FORLENZA, O. V. Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer. **Archives of Clinical Psychiatry**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 137-148, 2005.

GARG, P.; DUGGAL, N. Type 2 diabetes mellitus, its impact on quality of life and how the disease can be managed-a review. **Obesity Medicine**, Amsterdã, v. 35, n. 100459, p. 1-11,

2022.

GROSS, J. L.; SILVEIRO, S. P.; CAMARGO, J. L.; REICHEL, A. J.; AZEVEDO, M. J. de. Diabetes Melito: diagnóstico, classificação e avaliação do controle glicêmico. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, São Paulo, v. 46, n. 1, p. 16-26, 2002.

GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. **Archives Of Toxicology**, Berlin, v. 86, n. 3, p. 345-391, 2011.

HIERONYMUS, S. **For the love of hops: the practical guide to aroma, bitterness and the culture of hops**. 1. ed. Boulder: Brewers Publications, 2012.

KESKIN, Ş.; ŞİRİN, Y.; ÇAKIR, H. E.; KESKIN, M. An investigation of *Humulus lupulus* L.: phenolic composition, antioxidant capacity and inhibition properties of clinically important enzymes. **South African Journal of Botany**, Amsterdã, v. 120, p. 170-174, 2019.

KUBOTA, M. Hyperuricemia in Children and Adolescents: present knowledge and future directions. **Journal of Nutrition and Metabolism**, Londres, v. 2019, p. 1-8, 2019.

KUMAR, H.; DHALARIA, R.; GULERIA, S.; CIMLER, R.; SHARMA, R.; SIDDIQUI, S. A.; VALKO, M.; NEPOVIMOVA, E.; DHANJAL, D. S.; SINGH, R. Anti-oxidant potential of plants and probiotic spp. in alleviating oxidative stress induced by H₂O₂. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Amsterdã, v. 165, n. 115022, p. 1-13, 2023.

LEE, J.; KOO, N.; MIN, D. B. Reactive Oxygen Species, Aging, and Antioxidative Nutraceuticals. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Hoboken, v. 3, n. 1, p. 21-33, 2004.

LIU, X.; BAI, J.; JIANG, C.; SONG, Z.; ZHAO, Y.; NAUWYNCK, H.; JIANG, P. Therapeutic effect of Xanthohumol against highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. **Veterinary Microbiology**, Amsterdã, v. 238, n. 108431, p. 1-10, 2019.

LIN, M.; XIANG, D.; CHEN, X.; HUO, H. Role of characteristic components of *Humulus lupulus* in promoting human health. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 67, n. 30, p. 8291-8302, 2019.

LIPKOWITZ, M. S. Regulation of Uric Acid Excretion by the Kidney. **Current Rheumatology Reports**, Stuttgart ou Estugarda, v. 14, n. 2, p. 179-188, 2012.

LUZAK, B.; KASSASSIR, H.; RÓJ, E.; STANCZYK, L.; WATALA, C.; GOLANSKI, J. Xanthohumol from hop cones (*Humulus lupulus* L.) prevents ADP-induced platelet reactivity. **Archives of Physiology and Biochemistry**, Londres, v. 123, n. 1, p. 54-60, 2016.

MARQUES, S. P. D. **Nova proposta para rápida formação/combate dos Produtos de Glicação Avançada (AGEs) e propriedades farmacológicas de *Hancornia speciosa* Gomes**. 2017. 185 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

MARQUES, S. P. D.; OLIVEIRA, I. R. de; OWEN, R. W.; TREVISAN, M. T. S. Antioxidant

- Capacity, Angiotensin I Converting Enzyme (ACE) and Acetylcholinesterase Inhibition by Extracts of the Leaves and Bark of *Hancornia speciosa* Gomes. **Ijppr. Human**, Índia, v. 4, n. 1, 171-183, 2015.
- MARQUES, S. P. D.; OWEN, R. W.; SILVA, A. M. A. da; ALVES NETO, M. L.; TREVISAN, M. T. S. QuEChERS extraction for quantitation of bitter acids and xanthohumol in hops by HPLC-UV. **Food Chemistry**, Amsterdã, v. 388, n. 132964 p. 1-9, 2022.
- MCLELLAN, K. C. P.; BARBALHO, S. M.; CATTALINI, M.; LERARIO, A. C. Diabetes mellitus do tipo 2, síndrome metabólica e modificação no estilo de vida. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 20, n. 5, p. 515-524, 2007.
- MOHAMAD, A. S.; AKHTAR, M. N.; ZAKARIA, Z. A.; PERIMAL, E. K.; KHALID, S.; MOHD, P. A.; KHALID, M. H.; ISRAF, D. A.; LAJIS, N. H.; SULAIMAN, M. R. Antinociceptive activity of a synthetic chalcone, flavokawin B on chemical and thermal models of nociception in mice. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdã, v. 647, n. 1-3, p. 103-109, 2010.
- MUSHTAQ, A.; AZAM, U.; MEHREEN, S.; NASEER, M. M. Synthetic α -glucosidase inhibitors as promising anti-diabetic agents: recent developments and future challenges. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Amsterdã, v. 249, n. 115119, p. 1-28, 2023.
- NASSAR, E. M.; ABDELRAZEK, F. M.; AYYAD, R. R.; EL-FARARGY, A. F. Synthesis and Some Reactions of 1-aryl-4-acetyl-5-methyl-1,2,3-triazole Derivatives with Anticonvulsant Activity. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, Emirados Árabes Unidos, v. 16, n. 11, p. 926-936, 2016.
- NASCIMENTO, G. O. do. **Avaliação da atividade antioxidante e da inibição da enzima α -glucosidase presente no chá das folhas de *Coffea arabica***. 2019. 109 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.
- NASCIMENTO, G. O. do. **Avaliação das atividades antioxidantes, antiglicantes, inibidoras de enzimas digestivas e efeito hipoglicemiante dos extratos das folhas de café e seus principais compostos bioativos**. 2023. 133 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2023.
- NASCIMENTO, G. O.; MARQUES, S. P. D.; MAIA, C. E. G.; SOUSA, A. F. de; CUNHA, R. L.; MALTA, M. R.; OWEN, R. W.; FERREIRA, M. K. A.; SILVA, A. W. da; REBOUÇAS, E. L.; MENEZES, J. E. S. A. de; MARINHO, M. M.; MARINHO, E. S.; SANTOS, H. S. dos; SALIBA, A. S. M. C.; MASSARIOLI, A. P.; ALENCAR, S. M.; SARTORI, A. G. O.; TREVISAN, M. T. S. Hypoglycemic effect of *Coffea arabica* leaf extracts and major bioactive constituents. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, Londres, p. 1-16, 2023.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- OWEN, R. W.; GIACOSA, A.; HULL, W. E.; HAUBNER, R.; SPIEGELHALDER, B.;

BARTSCH, H. The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. **European Journal of Cancer**, Amsterdã, v. 36, n. 10, p. 1235-1247, 2000.

ÖZDEMİR, A.; ALTINTOP, M. D.; TURAN-ZITOUNI, G.; ÇİFTÇİ, G. A.; ERTORUN, İ.; ALATAŞ, Ö.; KAPLANCIKLI, Z. A. Synthesis and evaluation of new indole-based chalcones as potential antiinflammatory agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Amsterdã, v. 89, p. 304-309, 2015.

PEREZ-RUIZ, F.; CASTILLO, E.; CHINCHILLA, S. P.; HERRERO-BEITES, A. M. Clinical Manifestations and Diagnosis of Gout. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, Amsterdã, v. 40, n. 2, p. 193-206, 2014.

RETTBERG, N.; BIENDL, M.; GARBE, Leif-Alexander. Hop Aroma and Hoppy Beer Flavor: chemical backgrounds and analytical tools – a review. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, Londres, v. 76, n. 1, p. 1-20, 2018.

RHEE, I. K.; MEENT, M. van de; INGKANINAN, K.; VERPOORTE, R. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. **Journal of Chromatography A**, Amsterdã, v. 915, n. 1-2, p. 217-223, 2001.

RODDY, E.; CHOI, H. K. Epidemiology of Gout. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, Amsterdã, v. 40, n. 2, p. 155-175, 2014.

RUMPF, J.; BURGER, R.; SCHULZE, M. Statistical evaluation of DPPH, ABTS, FRAP, and Folin-Ciocalteu assays to assess the antioxidant capacity of lignins. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdã, v. 233, n. 123470, p. 1-9, 2023.

SAUTIN, Y. Y.; JOHNSON, R. J. Uric Acid: the oxidant-antioxidant paradox. **Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids**, Londres, v. 27, n. 6, p. 608-619, 2008.

SCHELTENS, P.; BLENNOW, K.; BRETELER, M. M. B.; STROOPER, B. de; FRISONI, G. B.; SALLOWAY, S.; FLIER, W. M. van der. Alzheimer's disease. **The Lancet**, Amsterdã, v. 388, n. 10043, p. 505-517, 2016.

SEIFRIED, H. E.; ANDERSON, D. E.; FISHER, E. I.; MILNER, J. A. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Amsterdã, v. 18, n. 9, p. 567-579, 2007.

SHARMA, P.; SINGH, M. An ongoing journey of chalcone analogues as single and multi-target ligands in the field of Alzheimer's disease: a review with structural aspects. **Life Sciences**, Amsterdã, v. 320, n. 121568, p. 1-21, 2023.

SRIDHAR, K.; CHARLES, A. L. In vitro antioxidant activity of Kyoho grape extracts in DPPH and ABTS assays: estimation methods for ec50 using advanced statistical programs. **Food Chemistry**, Amsterdã, v. 275, p. 41-49, 2019.

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

STOCKER, S. L.; MCLACHLAN, A. J.; SAVIC, R. M.; KIRKPATRICK, C. M.; GRAHAM, G. G.; WILLIAMS, K. M.; DAY, Richard O. The pharmacokinetics of oxypurinol in people with gout. **British Journal of Clinical Pharmacology**, Hoboken, v. 74, n. 3, p. 477-489, 2012.

TAQUI, R.; DEBNATH, M.; AHMED, S.; GHOSH, A. Advances on plant extracts and phytocompounds with acetylcholinesterase inhibition activity for possible treatment of Alzheimer's disease. **Phytomedicine Plus**, Amsterdã, v. 2, n. 1, p. 1-10, 2022.

TING, P. L.; RYDER, D. S. The bitter, twisted truth of the hop: 50 years of hop chemistry. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, Londres, v. 75, n. 3, p. 161-180, 2017.

TIVERON, A. P. **Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil**. 103 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, 2010.

TORRES, P. B.; PIRES, J. S.; SANTOS, D. Y. A. C. dos.; CHOW, F. Ensaio do potencial antioxidante de extratos de algas através do sequestro do ABTS^{•+} em microplaca. **Instituto de Biociências**, São Paulo, p. 1-4, 2017.

TREVISAN, M. T. S.; MACEDO, F. V. V. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 301-304, 2003.

TSUNODA, T.; SAMADI, A.; BURADE, S.; MAHMUD, T. Complete biosynthetic pathway to the antidiabetic drug acarbose. **Nature Communications**, Berlim, v. 13, n. 1, p. 1-12, 2022.

VANANGAMUDI, G.; SUBRAMANIAN, M.; THIRUNARAYANAN, G. Synthesis, spectral linearity, antimicrobial, antioxidant and insect antifeedant activities of some 2,5-dimethyl-3-thienyl chalcones. **Arabian Journal of Chemistry**, Amsterdã, v. 10, p. 1254-1266, 2017.

VAN CLEEMPUT, M.; CATTOOR, K.; BOSSCHER, K. de; HAEGEMAN, G.; KEUKELEIRE, D. de; HEYERICK, A. Hop (*Humulus lupulus*) - derived bitter acids as multipotent bioactive compounds. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 72, n. 6, p. 1220-1230, 2009.

WANG, L.; ZHANG, Y.; JOHNPAUL, I. A.; HONG, K.; SONG, Y.; YANG, X.; LV, C.; MA, C. Exploring two types of prenylated bitter compounds from hop plant (*Humulus lupulus* L.) against α -glucosidase in vitro and in silico. **Food Chemistry**, Amsterdã, v. 370, n. 130979, p. 1-10, 2022.

WANNENMACHER, J.; GASTL, M.; BECKER, T. Phenolic Substances in Beer: structural diversity, reactive potential and relevance for brewing process and beer quality. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Hoboken, v. 17, n. 4, p. 953-988, 2018.

WU, Chun-Nan; SUN, Li-Chin; CHU, Yung-Lin; YU, Roch-Chui; HSIEH, Chang-Wei; HSU, Hsien-Yi; HSU, Fu-Chiun; CHENG, Kuan-Chen. Bioactive compounds with anti-oxidative

and anti-inflammatory activities of hop extracts. **Food Chemistry**, Amsterdã, v. 330, n. 127244, p. 1-8, 2020.

WU, D; CEDERBAUM, A. I. Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. **Alcohol Res Health**, Bethesda, v. 27, n. 4, p. 277-284, 2003.

YANG, C.; LIU, Y.; TU, Y.; LI, L.; DU, J.; YU, D.; HE, P.; WANG, T.; LIU, Y.; CHEN, H. Chalcone derivatives as xanthine oxidase inhibitors: synthesis, binding mode investigation, biological evaluation, and admet prediction. **Bioorganic Chemistry**, Amsterdã, v. 131, n. 106320, p. 1-14, 2023.

ZHANG, W. EULAR evidence based recommendations for gout. Part II: management. report of a task force of the eular standing committee for international clinical studies including therapeutics (escisit). **Annals of the Rheumatic Diseases**, Londres, v. 65, n. 10, p. 1312-1324, 2006.

ZHU, Y.; PANDYA, B. J.; CHOI, H. K. Prevalence of gout and hyperuricemia in the US general population: the national health and nutrition examination survey 2007-2008. **Arthritis & Rheumatism**, Hoboken, v. 63, n. 10, p. 3136-3141, 2011.