



UNIVERSIDADE PARANAENSE – UNIPAR

Recredenciada pela Portaria – MEC n.º 747, de 10/09/2020 – D.O.U. 11/09/2020

Mantenedora: UNIPAR – SOCIEDADE EMPRESARIAL LTDA.

Coordenação de Pós-Graduação *Stricto Sensu* e Pesquisa

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Aplicada à Agricultura

Fabiana Pereira Alves da Silva

Potencial antibacteriano do extrato de *Humulus lupulus* L. no controle de agentes etiológicos de mastite.

**Umuarama
2026**

Fabiana Pereira Alves da Silva

Potencial antibacteriano do extrato de *Humulus lupulus* L. no controle de agentes etiológicos de mastite.

Dissertação apresentada como parte das exigências para a obtenção do grau de mestre em Biotecnologia Aplicada à Agricultura pela Universidade Paranaense - UNIPAR.

Orientador(a): Dra. Maria Graciela Iecher Faria Nunes

Coorientadora: Dra. Zilda Cristiani Gazim

Umuarama
2026

Ficha Catalográfica

S586p Silva, Fabiana Pereira Alves da.
Potencial antibacteriano do extrato de *Humulus lupulus* L. no controle de agentes etiológicos de mastite / Fabiana Pereira Alves da Silva. – Umuarama : Universidade Paranaense – UNIPAR, 2026.

39 f.

Orientadora: Dr^a. Maria Graciela Iecher Faria Nunes.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Paranaense – UNIPAR.

1. Ácidos amargos. 2. Resistência antimicrobiana. 3. Lúpulo.
4. Bacilos gram-negativos. 5. Pecuária. I. Universidade Paranaense – UNIPAR. II. Título.

(21 ed.) CDD: 582.18

Bibliotecária Responsável Regiane Luiza Campaneli CRB 9/2194

Potencial antibacteriano do extrato de *Humulus lupulus* L. no controle de agentes etiológicos de mastite.

Tese ou Dissertação aprovada como requisito obrigatório para obtenção do Grau de Doutor ou Mestre no Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Aplicada à Agricultura da Universidade Paranaense – UNIPAR, pela seguinte banca examinadora:

Dr Antonio Laverde Junior
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dr Ranulfo Piau Junior
Universidade Paranaense

Dra. Maria Graciela Iecher Faria Nunes
Universidade Paranaense

Universidade Paranaense – UNIPAR

Umuarama, 23 de fevereiro de 2026

AGRADECIMENTOS

A gratidão que sinto por ter chegado até aqui é imensa, e ela nasce de cada gesto de apoio que recebi ao longo dessa caminhada. De coração, agradeço a todas as pessoas que foram presença essencial em cada etapa desta jornada.

Deixo o meu agradecimento aos meus pais, Gisely Pereira Alves da Silva e Paulo Roberto Alves da Silva, pelo incentivo e apoio nessa jornada. Em especial, para a minha irmã Gabriely Pereira Alves da Silva por estar sempre comigo e acreditar em mim. Obrigada pela confiança que depositaram em mim, amo vocês!

Com carinho e admiração, a minha orientadora Maria Graciela Iecher Faria Nunes e a minha co-orientadora Zilda Cristiani Gazim, agradeço pela confiança que vocês depositam em mim, por todo o cuidado e pelo exemplo!

Aos professores, colegas de mestrado e a todos que em algum momento doaram do seu tempo e do seu conhecimento para a realização desse trabalho fica o meu agradecimento!

Aos meus amigos, que torcem por mim e estão sempre presentes no meu coração. E ao meu companheiro de jornada científica e da vida, Gabriel Augusto Rodrigues Beirão, agradeço por todos os momentos de apoio e compreensão, pela força e pela companhia!

Por fim, agradeço a Deus e ao Universo por me darem a força e a oportunidade de chegar até aqui!

Sumário

1. INTRODUÇÃO	9
2. MATERIAL E MÉTODOS	12
2.1 Material Vegetal	12
2.2 Coleta e Preparo do Extrato Bruto dos Cones de <i>Humulus lupulus</i> L.	12
2.2.1 Cálculo do rendimento dos extratos brutos	12
2.3 Identificação Química do Extrato Bruto dos Cones e Folhas de <i>H. lupulus</i> por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência Acoplada à Espectrometria de Massas de Alta Resolução (UHPLC-MS).	13
2.4 Ensaios de sensibilidade para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	14
2.4.1 Microrganismos e preparo do inóculo	14
2.4.2 Atividade antibacteriana pelo método de microdiluição em caldo e determinação da concentração bactericida mínima	14
2.5. Atividade antibacteriana contra isolados de mastite	15
2.6 Análise estatística	15
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
4. CONCLUSÕES	33
5. AGRADECIMENTOS	33
REFERÊNCIAS	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EB - Extrato Bruto

UHPLC/MS – Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas

CG / EM – Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.

Fabiana Pereira Alves da Silva

Potencial antibacteriano do extrato de *Humulus lupulus* L. no controle de agentes etiológicos de mastite.

RESUMO: A resistência bacteriana representa uma emergência global e impõe desafios críticos à saúde humana e animal. Nas áreas de produção, como pecuária leiteira, a mastite bovina é um fator crucial para o uso de antibióticos que levam ao surgimento de patógenos resistentes, gerando uma demanda por alternativas de combate eficazes e sustentáveis. Neste contexto, a investigação de agentes bioativos naturais, como o *Humulus lupulus* L. (lúpulo), oferece um caminho promissor devido a sua composição rica em ácidos amargos, ácidos fenólicos e flavonoides apontados em estudos como agentes antimicrobianos. Este estudo teve como objetivo analisar a eficácia da atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos das folhas e cones de quatro variedades de lúpulo (Cascade, Columbus, Comet e Nugget) e legitimar o potencial de ação contra isolados clínicos de patógenos associados à mastite. Os extratos foram obtidos através da técnica de maceração dinâmica com esgotamento de solvente e calculado o rendimento. Para a identificação química foi utilizada a cromatografia líquida de ultra-eficiência, acoplada à espectrometria de massa em tandem, visando identificar os principais compostos fenólicos e ácidos orgânicos do lúpulo. A atividade antimicrobiana foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, determinando a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM). Foram utilizadas oito cepas ATCCs para os testes e cepas de isolados clínicos de mastite bovina, como *Staphylococcus* spp. e isolados gram-negativos. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas e submetidos a análise estatística (ANOVA). Os resultados apresentam uma atividade seletiva contra o grupo gram-positivo. O melhor desempenho do extrato foi da variedade Columbus, alcançando o valor de CIM de 0,04 mg/mL frente a cepa de *S. aureus* ATCC 29213. A atividade bactericida (CBM) também foi evidenciada, para variedade Cascade atingindo o valor de 0,02 mg/mL para *P. aeruginosa* ATCC 15442 (gram-negativa). O resultado merece destaque por acentuar o mecanismo de ação diverso ou a presença de compostos bioativos capazes de ultrapassar a membrana externa das bactérias gram-negativas. Para os isolados de mastite, os testes revelaram que a variedade Cascade manteve a superioridade, inibindo o crescimento de *Staphylococcus* spp. com CIM de 0,04 mg/mL e CBM de 0,08 mg/mL, ressaltando a importância clínica do extrato dessa variedade. A suscetibilidade elevada para os isolados gram-positivos pode estar relacionada com a ação dos ácidos amargos do lúpulo sobre a parede celular bacteriana, composta por peptidoglicanos e estrutura mais simples. Os extratos etanólicos de lúpulo possuem potencial antimicrobiano e bactericida validado pelos testes *in vitro*, essencialmente contra patógenos gram-positivos mais prevalentes na etiologia da mastite.

Palavras-chave: Ácidos Amargos. Resistência Antimicrobiana. Lúpulo. Bacilos Gram-Negativos. Pecuária.

Fabiana Pereira Alves da Silva

Antibacterial potential of *Humulus lupulus* L. extract in the control of etiological agents of mastitis.

ABSTRACT: Antimicrobial resistance represents a global emergency and poses critical challenges to human and animal health. In production sectors such as dairy farming, bovine mastitis is a key factor driving the use of antibiotics, which leads to the emergence of resistant pathogens, creating a need for effective and sustainable alternatives. In this context, research into natural bioactive agents, such as *Humulus lupulus* L. (hops), offers a promising avenue due to its rich composition of bitter acids, phenolic acids, and flavonoids, which have been identified in studies as antimicrobial agents. The objective of this study was to analyze the efficacy of the antimicrobial activity of ethanolic extracts from the leaves and cones of four hop varieties (Cascade, Columbus, Comet, and Nugget) and to validate their potential for action against clinical isolates of pathogens associated with mastitis. The extracts were obtained using the dynamic maceration technique with solvent exhaustion, and the yield was calculated. For chemical identification, ultra-high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry was used to identify the main phenolic compounds and organic acids in the hops. Antimicrobial activity was determined using the broth microdilution method, measuring the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC). Eight ATCC strains were used for the tests, along with clinical isolates of bovine mastitis, such as *Staphylococcus* spp. and gram-negative isolates. All assays were performed in triplicate and subjected to statistical analysis (ANOVA). The results show selective activity against the gram-positive group. The best performance of the extract was observed in the Columbus variety, reaching an MIC value of 0.04 mg/mL against the *S. aureus* ATCC 29213 strain. Bactericidal activity was also observed, with the Cascade variety reaching a value of 0.02 mg/mL against *P. aeruginosa* ATCC 15442 (gram-negative). This result is noteworthy as it highlights a distinct mechanism of action or the presence of bioactive compounds capable of penetrating the outer membrane of gram-negative bacteria. For mastitis isolates, the tests revealed that the Cascade variety maintained its superiority, inhibiting the growth of *Staphylococcus* spp. with an MIC of 0.04 mg/mL and a MBC of 0.08 mg/mL, highlighting the clinical importance of the extract from this variety. The high susceptibility of gram-positive isolates may be related to the action of hop bitter acids on the bacterial cell wall, which is composed of peptidoglycans and has a simpler structure. Ethanolic extracts of hops possess antimicrobial and bactericidal properties that have been validated by in vitro tests, primarily against the gram-positive pathogens most commonly associated with mastitis.

Key-words: Bitter acids. Antimicrobial resistance. Hops. Gram-negative bacilli. Livestock farming.

Potencial antibacteriano do extrato de *Humulus lupulus* L. no controle de agentes etiológicos de mastite.

RESUMO: Este estudo avaliou a atividade antimicrobiana dos extratos brutos etanólicos (EBs) das folhas e cones de quatro variedades de *Humulus lupulus* L. (Cascade, Columbus, Comet e Nugget) e analisou o potencial de ação contra isolados clínicos de bactérias causadoras de mastite. O material vegetal foi obtido em canteiros experimentais na UEM, Campus Umuarama - PR. A identificação química dos EBs foi realizada através de UHPLC-MS pelo modo de ionização negativa. O delineamento experimental adotou a técnica de microdiluição em caldo, adaptada para produtos naturais, e determinou a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) em relação a oito cepas bacterianas padrões e isolados clínicos de mastite. Os resultados das análises foram submetidos à análise de variância, pelo método de Tukey e revelaram o potencial antimicrobiano e bactericida relevante. O melhor CIM registrado foi de 0,04 mg/mL (Columbus para *S. aureus* ATCC 29213) e o CBM de 0,02 mg/mL (Cascade em *P. aeruginosa* ATCC 15442). Para os isolados clínicos de mastite, a variedade Cascade atingiu um CIM de 0,04 mg/mL na cepa de *Staphylococcus spp.*, corroborando a eficácia dos extratos. A atividade mais consistente foi diante de bactérias gram-positivas, entretanto a variedade Nugget demonstrou resultados prósperos nos testes dos isolados gram-negativos de mastite. Sendo assim, conclui-se que os extratos de *H. lupulus* representam uma possibilidade natural válida *in vitro* para o controle de patógenos gram-positivos associados à mastite bovina.

Palavras-chave: Mastite Bovina. Atividade Antimicrobiana. Extratos Etanólicos. Lúpulo. Isolados Clínicos.

INTRODUÇÃO

Humulus lupulus L., é uma planta trepadeira, herbácea, dióica e anemófila, característica do gênero a qual pertence. Pertence à família Cannabaceae, nativa do Hemisfério Norte e clima temperado. Dentro do gênero *Humulus*, existem outras espécies como a *H. japonicus* e *H. yunnanensis*, entretanto, somente a espécie *H. lupulus* possui relevância para a indústria e medicina (Spósito *et al.*, 2019). A relevância do lúpulo decorre do fato de suas inflorescências concentrarem quantidades expressivas de α -ácidos, β -ácidos, óleos essenciais, resinas e compostos fenólicos, tradicionalmente associados ao amargor e ao aroma característicos das cervejas (Durello; Silva; Bogusz, 2019).

Os cones da espécie em sua totalidade são compostos por resinas, óleos essenciais, lipídios e polifenóis. As resinas compõem de 10-30% da matéria seca dos cones e são divididos em resinas macias constituindo cerca de 9 a 27,5% dos cones e as resinas duras que são 1,5 a 2,5% da massa seca dos cones (Yan *et al.*, 2019). Os ácidos amargos abrangem as humulonas preniladas de floroglucinol (α -ácidos) e as lupulonas (β -ácidos). Além de ácidos fenólicos como os ácidos ferúlico, protocatecuico, vanílico, gálico, *p*-cumárico e outros compostos como a cumarina, naringenina e prenilflavonoides como o xantohumol (Silva *et al.*, 2025).

Nas últimas décadas, cresce o interesse científico pelas propriedades biológicas de plantas usadas na medicina tradicional. Nesse contexto, o lúpulo destaca-se como uma espécie cujas atividades biológicas vêm sendo amplamente investigadas. Outras propriedades documentadas são a ação antimicrobiana, antifúngica, antioxidante, antiinflamatória, antitumoral, antiviral e cardioprotetora (Roehrer *et al.*, 2019; Astray *et al.*, 2020).

A mastite bovina é uma doença causada por bactérias, fungos e leveduras, os principais agentes bacterianos causadores são *Streptococcus* spp., *Klebsiella* spp., *Escherichia coli* e *Staphylococcus* spp., e se proliferam através da má higiene dos animais, práticas insalubres de ordenha e contaminação ambiental (Cobirka; Tancin; Slama, 2020).

O tratamento padrão inclui o uso de antibióticos e agentes antiinflamatórios, porém, a crescente resistência bacteriana aos antibióticos levanta preocupações e geram a necessidade de tratamentos alternativos para o controle desses patógenos. As plantas

medicinais são alternativas cruciais no tratamento de diversas doenças infecciosas através de formulações utilizando os bioativos extraídos de plantas (Chaachouay e Zidane, 2022).

As plantas oferecem suporte como suprimento terapêutico devido às suas características biológicas, atualmente quase 50% das formulações farmacêuticas são derivadas de produtos naturais (Vaou *et al.*, 2021). A fitoterapia é frequentemente utilizada em conjunto com os tratamentos convencionais para comorbidades conhecidas e é comprovada a possibilidade de terapias sinérgicas, destacando que a junção de plantas medicinais e antibióticos elevam o efeito antimicrobiano e podem atuar como agentes moduladores contra resistência bacteriana (Kovačević *et al.*, 2021).

Os compostos do lúpulo com potencial antimicrobiano encontram-se mais concentrados nas inflorescências femininas (cones), uma vez que esses órgãos são particularmente ricos em resinas, contendo múltiplos ácidos amargos (α e β - ácidos), óleos essenciais e flavonóides (Karabín *et al.*, 2016).

Os α e β - ácidos, são misturas complexas como as humulonas e lupulonas, respectivamente, e participam dos mecanismos de ação antimicrobiano dos cones, além desses compostos, flavonóides como o xantohumulol e o kaempferol também formam um importante grupo responsável por essa característica terapêutica das inflorescências (Kolenc *et al.*, 2022).

Diferente de outros fármacos, os antibióticos possuem um ciclo de vida limitado pelo próprio uso, que acelera o declínio de sua utilidade clínica. A falta no setor farmacêutico em novas pesquisas e descobertas de novos agentes nas últimas duas décadas acentuou a disparidade entre a necessidade terapêutica global e a disponibilidade de tratamentos inovadores (Schneider, 2021). Sendo assim, acarreta uma redução progressiva da capacidade médica em manejar infecções bacterianas, comprometendo a segurança dos protocolos de saúde atuais (Laxminarayan *et al.*, 2013).

Para o controle e tratamento da mastite bovina a fitoterapia oferece um tratamento complementar com o uso sinérgico de extratos vegetais com antibióticos sem levar a citotoxicidade, especialmente em casos onde já existe a resistência bacteriana ou restrições quanto ao uso de antimicrobianos (Debruyne *et al.*, 2025).

Diante do potencial antimicrobiano dos compostos presentes no lúpulo e da necessidade global em encontrar alternativas para o controle da mastite bovina, o presente estudo teve como objetivo determinar a atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos

das folhas e cones das quatro cultivares de *Humulus lupulus* L. (Cascade, Columbus, Comet e Nugget) e avaliou o seu potencial de ação contra isolados clínicos de bactérias causadoras de mastite e bactérias ATCCs.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material Vegetal

Os cones e folhas de *H. lupulus* foram obtidos de canteiros experimentais cuja cultura encontra-se implantada em novembro de 2022 em uma área de 1000 m² localizada na Universidade Estadual de Maringá - UEM, Campus Umuarama/PR, na região noroeste do Estado do Paraná, nas coordenadas Latitude: 23°06'20.2"S e Longitude: 52°26'45.3"W,

Quatro variedades encontram-se implantadas: Cascade, Columbus, Comet e Nugget, desenvolvidas em programas de melhoramento norte-americanos. A coleta dos cones ocorreu no período da manhã, às 08h, quando os mesmos se apresentaram totalmente desenvolvidos.

2.2 Coleta e Preparo do Extrato Bruto dos Cones de *Humulus lupulus* L.

A primeira coleta do material vegetal foi realizada em 03 de janeiro de 2023. Após a coleta, o material foi submetido à secagem em temperatura ambiente. O solvente escolhido para o presente estudo foi baseado na pesquisa de Lela *et al.* (2022), os extratos dos cones e folhas foram preparados por maceração dinâmica com renovação do solvente. Os extratos foram evaporados a 45° C em evaporador rotativo até a eliminação total do solvente 95% de etanol/água (EtOH/H₂O). Este método é otimizado para extração dos polifenóis do lúpulo.

2.2.1 Cálculo do rendimento dos extratos brutos:

O rendimento dos extratos brutos dos cones e folhas (Eq.1) foi calculado pela razão da massa seca do extrato (g) pela massa do material vegetal seco (g).

Fórmula do cálculo de rendimento de extrato bruto (Rodrigues *et al.*, 2011).

$$\text{Eq. 1: } R = \frac{m(\text{extrato obtido})}{m(\text{massa vegetal})} \times 100 = R\%$$

2.3 Identificação Química do Extrato Bruto dos Cones e Folhas de *H. lupulus* por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência Acoplada à Espectrometria de Massas de Alta Resolução (UHPLC-MS).

Os extratos brutos dos cones e folhas de *H. lupulus* foram analisados utilizando cromatografia líquida de ultra-eficiência, acoplada à espectrometria de massa em tandem (UHPLC-MS/MS) (Shimadzu® modelo 8050 MS e Nexera® X2 HPLC, Kyoto, Japão) operando em modo de monitoramento de múltiplas reações (MRM), equipada com uma fonte de *electrospray ionization* (ESI). A ESI foi utilizada em modo negativo e positivo, digitalizada com o modo de monitorização de reações múltiplas (MRM). A energia de colisão foi de 15 V (positiva) e 30 V (negativa). A tensão da interface foi de 3 kV, a corrente de 7 μ A, a temperatura de 300°C e as taxas de fluxo do gás de nebulização e do gás de secagem foram de 3 L/min e 10 L/min, respectivamente. O argônio foi utilizado como gás de colisão a uma pressão máxima de 20 mPa. A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna C18 (5 μ m, 150 mm \times 4,6 mm Shimadzu®). As fases móveis foram água ultrapura acidificada com ácido fórmico a 0,1% (A) e metanol grau MS (Merck®, Darmstadt, Alemanha) (B). A eluição foi realizada em gradiente linear, 1–9 min (20% B), 10–15 min (40% B) e 16–30 min (10% B), a um caudal de 0,5 mL/min, a 40 °C. As amostras foram filtradas (membrana hidrofóbica de PVDF, tamanho de poro 0,45 μ m e 25 mm de diâmetro), e o volume de injeção foi de 1 μ L, as injeções foram realizadas em triplicata. A quantificação e confirmação dos analitos estruturais foram realizadas através da comparação dos tempos de retenção e da transição MRM utilizando padrões analíticos externos, ao final foram construídas curvas analíticas na faixa de 10–250 μ g/L. Para os padrões foram utilizados os seguintes compostos: morina, isovanilina, ácido gálico, quercetina, naringenina, hidroxibenzaldeído, seringaldeído, ácido siríngico, ácido vanílico, ácido salicílico, ácido ferúlico, rutina, luteolina, kaempferol, cumarina, cafeína, ácido nicotínico, ácido málico e fumárico.

2.4 Ensaios de sensibilidade para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

2.4.1 Microrganismos e preparo do inóculo

A atividade antibacteriana dos extratos brutos (EBs) foram testadas em oito cepas bacterianas, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* Typhi ATCC 19214, *Bacillus cereus* ATCC 12228, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *S. epidermidis* ATCC 12228, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 e *Enterobacter cloacae* Newprov 0083. Os microrganismos foram provenientes do Laboratório de Biotecnologia de Produtos Vegetais e Microrganismos da Universidade Paranaense.

Para os ensaios foi preparada uma diluição da massa celular bacteriana a partir do cultivo de 24 h. A concentração final de células bacterianas foi ajustada de acordo com a Escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ mL) em solução salina estéril 0,9% e realizada a leitura em espectrofotômetro (Spectra Max Plus) a 625 nm. A diluição foi realizada em suspensão 1:10 em meio da cultura Mueller Hinton Caldo e adicionado a microplaca, obtendo-se um inóculo $1,5 \times 10^7$ UFC/ mL.

2.4.2 Atividade antibacteriana pelo método de microdiluição em caldo e determinação da concentração bactericida mínima

A concentração inibitória mínima (CIM) de cada microrganismo frente aos EBs foi realizada por meio da técnica de microdiluição em série usando microplacas de 96 poços. Para cada microrganismo, foi realizada uma suspensão padronizada em solução salina conforme descrito no item anterior. A CIM foi estabelecida de acordo com o método de microdiluição em caldo (CLSI, 2015) modificado para produtos naturais. Os EBs foram avaliados na faixa de concentração entre 0,009 e 10 mg/ mL. Após a diluição seriada, 50 µl do inóculo foi adicionado em cada poço e submetido à incubação a 35° C por 24 h. A leitura foi realizada com a adição de 20 µL de revelador 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio 1,0% em cada poço seguida de incubação das microplacas a 35° C por 20 min. A CIM foi definida pela menor concentração que resultou na inibição do crescimento visual de acordo com o revelador. Como controle positivo foram utilizados o aminoglicosídeo estreptomicina, o conservante nitrito de sódio e o sorbato de potássio.

Após a leitura, 2 µL de cada poço foi cultivado em meio de cultura Mueller Hinton Agar e incubados a 35° C/ 24h para determinação da concentração bactericida mínima (CBM) dos EBs entre os microrganismos estudados. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

2.5. Atividade antibacteriana contra isolados de mastite

Após a avaliação dos melhores resultados de CIM contra as bactérias padrões, os melhores EBs, foram testados contra oito cepas de bactérias isoladas de mastite bovina: *E. coli*, *S. aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus* spp., 24-05 (D0) BGN, 25-07 (D60) BGN não fermentadores, 26-09 (D0) BGN e *Klebsiella oxytoca*. A metodologia utilizada para essa atividade foi descrita no item 2.4.

2.6 Análise estatística

Os ensaios foram realizados em triplicata, em delineamento inteiramente casualizado (DIC). A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro–Wilk e a homogeneidade das variâncias pelo teste de Bartlett. Após a análise de variância (ANOVA), as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), utilizando o software Sisvar versão 5.8 (Ferreira, 2014).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta o rendimento dos extratos brutos de cones e folhas das quatro variedades de *H. lupulus*, indicando maiores rendimentos para os cones em comparação às folhas.

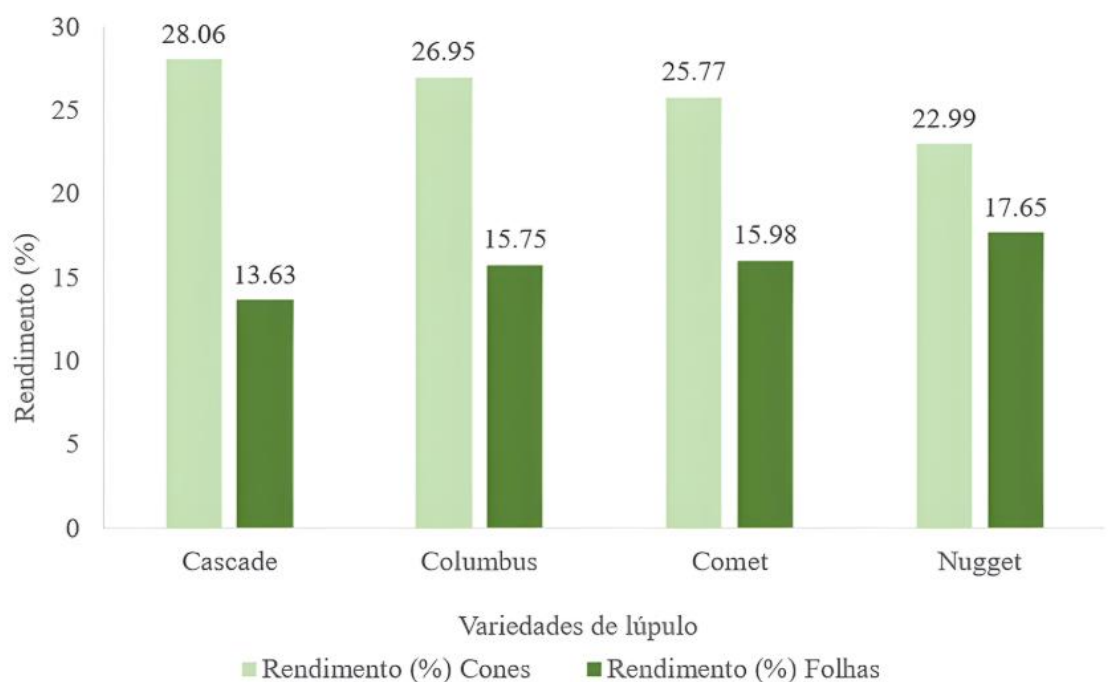


Figura 1: Gráfico comparativo de rendimento (%) do extrato bruto dos cones e folhas das quatro variedades de *Humulus lupulus* (Cascade, Columbus, Comet e Nugget).

O extrato bruto dos cones e folhas de *H. lupulus* possui uma composição rica e diversificada de compostos, de acordo com o resultado das análises por UHPLC-MS/MS (Tabelas 1 e 2) foram identificados 27 compostos nos cones e 21 compostos nas folhas, as principais classes apontadas nas duas identificações são os ácidos e aldeídos fenólicos, flavonoides e ácidos orgânicos.

Tabela 1. Composição química do extrato bruto (CE) dos cones de *Humulus lupulus* L. das variedades Cascade, Columbus, Comet e Nugget ($\mu\text{g/g}$).

COMPOSTO	CASCADE	COLUMBUS	COMET	NUGGET
ALDEÍDOS FENÓLICOS				
Hidroxibenzaldeído	$116,78 \pm 7,10^B$	$77,74 \pm 5,29^C$	$183,84 \pm 9,81^A$	$143,94 \pm 6,33^B$
Vanilina	$101,14 \pm 1,64^A$	$45,22 \pm 2,15^B$	$21,98 \pm 1,47^C$	$92,16 \pm 3,75^A$
Isovanilina	$21,21 \pm 0,07^B$	$11,21 \pm 0,15^C$	$11,72 \pm 0,94^C$	$38,48 \pm 0,34^A$
Seringaldeído	$27,75 \pm 0,56^A$	$11,20 \pm 0,82^C$	$16,10 \pm 0,10^B$	$27,06 \pm 0,26^A$
ÁCIDOS FENÓLICOS				
Ácido Clorogênico	$107,21 \pm 5,42^B$	$185,41 \pm 15,80^A$	$59,12 \pm 1,34^C$	$127,99 \pm 2,17^B$
Ácido Sinápico	$66,45 \pm 0,58^B$	$37,28 \pm 0,41^C$	$31,40 \pm 0,45^D$	$118,62 \pm 1,60^A$
Ácido Gálico	$92,62 \pm 3,75^B$	$106,38 \pm 1,89^A$	$32,43 \pm 1,45^D$	$76,81 \pm 2,15^C$
Ácido Protocateuico	$272,16 \pm 15,78^{BC}$	$335,85 \pm 20,23^B$	$211,05 \pm 9,62^C$	$416,96 \pm 23,06^A$
Ácido Siringico	$12,35 \pm 0,29^{BC}$	$15,63 \pm 1,29^B$	$10,29 \pm 0,77^C$	$23,22 \pm 1,55^A$
Ácido Vanílico	$59,59 \pm 4,30^A$	$35,78 \pm 3,07^B$	$35,17 \pm 0,74^B$	$63,44 \pm 0,94^A$
Ácido <i>p</i> -Hiroxibenzoico	$226,60 \pm 7,66^B$	$129,27 \pm 1,71^D$	$175,01 \pm 10,26^C$	$330,61 \pm 14,33^A$
Ácido <i>p</i> -Cumarico	$109,67 \pm 5,55^B$	$85,87 \pm 3,41^B$	$202,33 \pm 11,66^A$	$176,68 \pm 2,28^A$
Ácido Cafeico	$14,08 \pm 1,13^B$	$17,34 \pm 1,40^B$	$13,58 \pm 1,26^B$	$27,26 \pm 0,64^A$
Ácido Ferulico	$122,55 \pm 7,80^B$	$92,77 \pm 2,15^C$	$120,25 \pm 2,27^B$	$143,96 \pm 0,04^A$
ÁCIDOS ORGÂNICOS				
Ácido Fumárico	$193,09 \pm 3,64^B$	$120,08 \pm 8,85^C$	$82,05 \pm 7,82^D$	$193,09 \pm 3,64^A$
Ácido Quínico	$64,25 \pm 1,51^C$	$125,29 \pm 4,21^A$	$104,75 \pm 3,12^B$	$61,99 \pm 0,80^C$

Ácido Malico	191,73 ± 0,14 ^D	223,21 ± 8,87 ^C	354,37 ± 10,89 ^A	309,66 ± 2,55 ^B
ALCALÓIDES e ÁCIDOS PIRIDÍNICOS				
Ácido Nicotínico	46,52 ± 1,95 ^A	19,98 ± 1,59 ^C	14,56 ± 0,19 ^C	37,84 ± 2,82 ^B
Cafeína	6,71 ± 0,28 ^A	3,55 ± 0,20 ^B	5,80 ± 0,30 ^A	5,99 ± 0,02 ^A
LACTONAS				
Cumarina	<1µg/G ^A	<1µg/G ^A	<1µg/G ^A	<1µg/G ^A
FLAVONÓIDES				
Catequina	54,83 ± 0,17 ^B	51,30 ± 4,85 ^B	53,42 ± 4,94 ^B	177,18 ± 0,66 ^A
Morina	150,76 ± 9,48 ^B	86,94 ± 2,78 ^C	141,04 ± 1,58 ^B	265,37 ± 10,28 ^A
Epicatequina	53,38 ± 4,89 ^B	56,32 ± 1,15 ^B	71,29 ± 6,68 ^B	174,77 ± 13,28 ^A
Quercetina	117,35 ± 11,65 ^B	101,97 ± 7,70 ^B	159,57 ± 0,01 ^A	164,32 ± 12,59 ^A
Rutina	>500µg/G ^A	>500µg/G ^A	>500µg/G ^A	>500µg/G ^A
Luteolina	<1µg/G ^A	<1µg/G ^A	<1µg/G ^A	<1µg/G ^A
Naringenina	13,19 ± 1,18 ^B	14,42 ± 0,33 ^B	4,44 ± 0,10 ^C	35,77 ± 2,57 ^A

Os resultados representam as médias ± desvio padrão. Letras diferentes na linha indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($\leq 0,05$).

Tabela 2. Composição química do extrato bruto (CE) das folhas de *Humulus lupulus* L. das variedades Cascade, Columbus, Comet e Nugget (µg/g).

COMPOSTO	CASCADE	COLUMBUS	COMET	NUGGET
ALDEÍDOS FENÓLICOS				
Hidroxibenzaldeído	33,898±0,598 ^B	117,360±6,586 ^A	119,836±8,836 ^A	109,823±5,818 ^A
Vanilina	102,835±5,839 ^A	196,922±10,557 ^{AB}	248,363±22,271 ^C	157,535±1,061 ^B
Isovanilina	21,776±1,694 ^B	28,420±1,958 ^A	22,678±0,425 ^{AB}	27,601±1,398 ^{AB}
Aldeído Siringico	17,992±0,985 ^B	40,758±1,093 ^A	22,743±2,206 ^B	34,031±2,649 ^A
ÁCIDOS FENÓLICOS				
Ácido Clorogenico	120,079±2,589 ^B	116,728±1,919 ^A	88,510±7,101 ^B	114,786±0,465 ^B
Ácido Sinápico	13,588±0,159 ^B	68,604±4,498 ^A	15,899±0,880 ^B	60,870±4,385 ^A
Ácido Protocatéquico	150,327±7,818 ^C	440,340±1,069 ^A	198,009±3,340 ^B	154,820±12,153 ^C
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico	160,596±10,599 ^C	402,108 ±335 ^A	259,665±13,260 ^B	261,192±13,661 ^B
Ácido <i>p</i> -cumárico	121,808±8,819 ^B	324,489±12,106 ^A	316,636±11,398 ^A	351,902±2,624 ^A
Ácido Cafeico	57,132±2,264 ^B	89,278±2,750 ^A	57,931±3,287 ^B	67,170±5,059 ^B
Ácido Ferúlico	124,179±6,323 ^B	33,175±28,197 ^A	78,208±2,748 ^B	79,097±0,992 ^B
ÁCIDOS ORGÂNICOS				
Ácido Quínico	62,762±2,371 ^B	66,513±0,521 ^B	49,185±2,577 ^C	81,253±3,374 ^A
Ácido Málico	41,851±0,060 ^A	42,080±1,511 ^A	21,753±1,731 ^B	25,632±0,138 ^B
ALCALÓIDES e ÁCIDOS PIRIDÍNICOS				
Ácido Nicotínico	113,368±4,824 ^B	175,723±8,326 ^A	53,480±3,968 ^D	76,379±2,059 ^C
Cafeína	16,126±0,904 ^A	18,973±0,329 ^A	102,02±0,865 ^B	18,023±1,731 ^A
FLAVONÓIDES				
Catequina	ND	ND	74,206±5,217 ^A	71.339±2,473 ^A
Epicatequina	ND	ND	79,518±6,356 ^A	81,253±3,374 ^A
Quercetina	ND	ND	11,823±0,972 ^A	6,845±0,024 ^B

Rutina	>500µg/g ^A	>500µg/g ^A	>500µg/g ^A	>500µg/g ^A
Luteolina	<1µg/g ^A	<1µg/g ^A	<1µg/g ^A	<1µg/g ^A
Naringenina	ND	ND	8,395±0,635 ^B	36,018±1,652 ^A

Os resultados representam as médias ± desvio padrão. Letras diferentes na linha indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($\leq 0,05$).

Nos cones (Tabela 1), destacaram-se quantitativamente o ácido protocatéquico, o ácido *p*-hidroxibenzoico e a rutina (>500 µg/g em todas as variedades). A variedade Nugget apresentou, em geral, as maiores concentrações de metabólitos, com o ácido protocatéquico atingindo o teor de $416,96 \pm 23,06$ µg/g de extrato seco. Em relação às folhas (Tabela 2), observou-se um perfil químico qualitativamente semelhante ao dos cones, mas com variações significativas nas concentrações dos compostos. A concentração de determinados ácidos fenólicos nas folhas de algumas variedades, como o ácido protocatéquico na variedade Columbus ($440,34 \pm 1,069$ µg/g), superando o maior teor registrado nos cones e a rutina (>500 µg/g em todas as variedades). Esse resultado indica que, para compostos de polaridade média a alta, como fenólicos e aldeídos, as folhas podem constituir uma fonte igualmente ou até mais rica que os cones.

A análise estatística confirmou diferenças significativas nas concentrações entre as cultivares, tanto nos cones quanto nas folhas ($p < 0,05$). Os ácidos amargos (α e β -ácidos), são uma classe de caráter lipofílico presentes nas resinas de lúpulo dos cones e são apontados como participantes na ação antimicrobiana do lúpulo (Duarte *et al.*, 2022). No presente estudo, foi utilizada a metodologia cromatográfica e solventes específicos para otimizar a extração e identificação dos ácidos fenólicos e flavonoides.

Devido a especificidade do solvente e a limitação cromatográfica nas análises não foi possível identificar os α e β -ácidos, entretanto, foram identificados grupos de flavonóis e flavanonas como a quercetina, naringenina e rutina, compostos que possuem potencial antimicrobiano contra bactérias gram-positivas (Kramer *et al.*, 2015).

A quercetina, composto flavonoide abundante na composição química dos cones de lúpulo, apresenta atividade eficiente na inibição do crescimento de bactérias gram-positivas e gram-negativas, devido a capacidade do composto de

causar a ruptura da parede celular bacteriana e inibir a síntese de ácidos nucleicos e proteínas, além de prevenir a formação de biofilme bacteriano (Veiko *et al.*, 2023).

Wang *et al.* (2019), relatou que o tratamento com a quercetina reduziu a permanência de bactérias em superfícies de cateteres, atuou na diminuição da concentração bacteriana nos rins e aliviou abscessos renais *in vivo*.

A rutina, é um polifenol importante em ensaios antimicrobianos, capaz de reduzir a capacidade das bactérias *P. aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) de formar biofilmes (Ivanov *et al.*, 2022).

A naringenina também possui atividade antibacteriana contra isolados clínicos de *S. aureus*, inibindo o crescimento da bactéria e a formação de biofilme. Os compostos flavonoides também interferem no metabolismo da *S. aureus*, demonstrando um efeito bactericida ao causar danos fisiológicos às bactérias (Zhang *et al.*, 2025).

A avaliação da CIM e da CBM foi realizada para os EBs obtidos das folhas e dos cones. Observou-se que os EBs das folhas não apresentaram atividade antimicrobiana frente aos microrganismos testados, com resultados superiores a 10 mg/mL em todos os ensaios. Estudos indicam que as folhas de lúpulo apresentam potencial como fonte de compostos fenólicos e ácidos orgânicos, entretanto, são escassos os estudos focados nesse subproduto e são necessárias mais pesquisas futuras para constatar a atividade antimicrobiana das folhas.

No estudo de Abram *et al.* (2015), foram testados os extratos das folhas e dos cones das variedades Aurora e Hallertauer Magnum, nativas da Europa Central, e obtiveram uma atividade antimicrobiana para os cones no CIM contra *S. aureus* na faixa de 0,0013 mg/mL a 0,0029 mg/mL, valores consideravelmente notáveis. Para as folhas foi concluído o potencial antioxidante, porém, para a ação antimicrobiana são necessárias mais análises para determinar a ação contra bactérias e os compostos envolvidos.

A Tabela 3 apresenta exclusivamente os valores obtidos para os EBs dos cones, além dos resultados referentes aos agentes antimicrobianos de referência nitrito de sódio, sorbato de potássio e estreptomicina, utilizados como controles positivos para viabilizar a comparação dos dados.

Tabela 3. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do extrato bruto dos cones de *Humulus lupulus* L. e de agentes antimicrobianos de referência frente a microrganismos indicadores.

Bactérias	Extrato Etanólico dos Cones (mg/mL)				Controle Positivo (mg/mL)		
	Cascade	Columbus	Comet	Nugget	Nitrito de Sódio	Sorbato de Potássio	Estreptomicina
	CIM/CBM				CIM/CBM		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	2.92 ± 1.91 Ba	0.04 ± 0.00 Aa	0.31 ± 0.00 Aa	10 ± 0.00 Ca	1,25 ± 0,00 Aa	10 ± 0,00 Bb	0,02 ± 0,00 Aa
	> 10	> 10	2.50 ± 0.00 Aa	>10	0,16 ± 0,00 Aa	>10	0,31 ± 0,00 Bb
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 12228	10 ± 0.00 Bb	2.08 ± 0.72 Ab	2.50 ± 0.00 Ab	10 ± 0.00 Ba	1,25 ± 0,00 Aa	10 ± 0,00 Bb	0,02 ± 0,00 Aa
	> 10	5 ± 0.00 Aa	>10	10 ± 0.00 Ba	10 ± 0,00 Bb	>10	0,31 ± 0,00 Ab
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	>10	>10	>10	>10	1,25 ± 0,00 Aa	2,5 ± 0,00 Ba	0,02 ± 0,00 Aa
	>10	>10	>10	>10	10 ± 0,00 Cb	5 ± 0,00 Ba	0,31 ± 0,00 Ab
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	10 ± 0.00 Bb	10 Bc	2.50 ± 0.00 Ab	10 ± 0.00 Ba	1,25 ± 0,00 Aa	10 ± 0,00 Bb	0,02 ± 0,00 Aa
	>10	>10	5 ± 0.00 Aa	>10	>10	>10	0,08 ± 0,00 Aa

Os resultados representam as médias ± desvio padrão. Letras representam diferenças significativas. Letras maiúsculas para análise do CIM em linha, letras maiúsculas em negrito para análise do CBM em linha, pelo teste de Tukey ($\leq 0,05$). Letras minúsculas para análise do CIM em coluna, letras minúsculas em negrito para análise do CBM em coluna, pelo teste de Tukey ($\leq 0,05$).

Continuação tabela 3

Bactérias	Extrato Etanólico dos Cones (mg/mL)				Controle Positivo (mg/mL)		
	Cascade	Columbus	Comet	Nugget	Nitrito de Sódio	Sorbato de Potássio	Estreptomicina
	CIM/CBM				CIM/CBM		
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	1.25 ± 0.00 Aa	1.67 ± 0.72 Ab	1.25 ± 0.00 Ac	10 ± 0.00 Ba	1,04 ± 0,36 Aab	1,25 ± 0,00 Aa	0,02 ± 0,00 Aa
	> 10	> 10	> 10	> 10	10 ± 0,00 Bb	2,5 ± 0,00 Aa	>10
<i>Salmonella</i> Typhi ATCC 19214	6.67 ± 2.89 Bb	0.31 ± 0.00 Aa	0.31 ± 0.00 Aa	10 ± 0.00 Ca	1,25 ± 0,00 Ab	10 ± 0,00 Bc	0,08 ± 0,00 Ab
	> 10	2.50 ± 0.00 Aa	2.50 ± 0.00 Aa	10 ± 0.00 Ba	>10	>10	0,31 ± 0,00 Aa
<i>Enterobacter cloacae</i> NewProv	10 ± 0.00 Cc	0.63 ± 0.00 Aab	10 ± 0.00 Bd	>10	0,78 ± 0,47 Aab	>10	0,02 ± 0,00 Aa
	>10	>10	10 ± 0.00 Ab	>10	>10	>10	>10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	>10	>10	1.25 ± 0.00 Ab	>10	0,31 ± 0,00 Aa	2,5 ± 0,00 Bb	0,08 ± 0,00 Ab
	0.02 ± 0.00 Aa	>10	>10	>10	2,5 ± 0,00 Ba	>10	0,31 ± 0,00 Aa

Os resultados representam as médias ± desvio padrão. Letras representam diferenças significativas. Letras maiúsculas para análise do CIM em linha, letras maiúsculas em negrito para análise do CBM em linha, pelo teste de Tukey ($\leq 0,05$). Letras minúsculas para análise do CIM em coluna, letras minúsculas em negrito para análise do CBM em linha, pelo teste de Tukey ($\leq 0,05$).

A análise estatística foi realizada separadamente para os ensaios de CIM e CBM e entre as variedades. Oito cepas bacterianas foram testadas frente ao extrato etanólico das folhas e cones de *Humulus lupulus* L. (lúpulo). Na análise dos resultados antimicrobianos dos extratos etanólicos dos Cones, observou-se um bom potencial nos resultados contra o grupo das bactérias gram-positivas (Tabela 3). A variedade Columbus apresentou a maior eficácia em inibição de crescimento contra *S. aureus* ATCC 29213, com o teor de 0,04 mg/ mL, além de apresentar a melhor atividade contra a bactéria gram-negativa *E. cloacae* NewProvv (0,63 mg/ mL), embora não tenha apresentado ação bactericida mínima (CBM >10 mg/ mL) na faixa testada (Tabela 3).

A variedade Comet destacou-se pela capacidade bactericida contra *S. aureus* ATCC 29213, com o teor de 2,50 mg/ mL, caracterizando potencial de ação bactericida. O extrato de Comet também atingiu valores de CIM de $0,31 \pm 0,00$ mg/ mL contra *S. aureus* ATCC 29213, demonstrando potencial inibitório relevante.

As variedades Cascade e Nugget tiveram resultados de CIM e CBM significativamente mais elevados que o extrato de Columbus, porém ainda ativos. O valor de CIM de Cascade foi de 2,92 mg/ mL contra *S. aureus* e 1,25 mg/ mL contra *E. coli*, sendo a variedade que demonstrou menor diferença de potência entre gram-positivas e gram-negativas, embora com menor eficácia geral. A análise de todos os resultados, apesar da variação dos teores, confirma o CIM da variedade Columbus de 0,04 mg/ mL contra *S. aureus* ATCC 29213, sendo o mais relevante resultado em termos de potencial antimicrobiano dos extratos, sugerindo a capacidade seletiva do perfil fitoquímico dos cones pela estrutura da membrana gram-positiva.

No estudo de Kiofentzoglou *et al.* (2025), foram testados os extratos hidroalcoólicos de cones de lúpulo e obtiveram teores de atividade antimicrobiana que varia de 0,039 mg/mL para *S. aureus* até 0,625 mg/mL para *P. aeruginosa*. Esses resultados corroboram os valores obtidos neste presente estudo, do CIM da variedade Columbus contra *S. aureus* ATCC 29213 de 0,04 mg/ mL. Essa similaridade representa que a variedade Columbus possui perfil fitoquímico com grande eficácia inibitória contra bactérias gram-positivas.

Os resultados exibidos na Tabela 3 demonstram que a avaliação de CIM e CBM dos agentes antimicrobianos de referência (Nitrito de sódio, Sorbato de Potássio e Estreptomicina) apresentou resultados que corroboram a seletividade esperada desses agentes. O nitrito de sódio, é um conservante alimentício tipicamente utilizado para a conservação e processamento de carnes, devido a sua capacidade de inibir o crescimento de microrganismos, atrasar a rancidez do alimento, preservar o aroma e sabor da carne e a cor vermelha (Zhang *et al.*, 2023). O nitrito de sódio apresentou maior potência contra bactérias gram-positivas (Tabela 3), frente a *S. aureus* ATCC 29213 o CIM foi de 1,25 mg/ mL, com um CBM menor de 0,16 mg/mL, o que indica forte ação bactericida. Em contrapartida, as bactérias gram-negativas (*E. coli* e *Salmonella* Typhi), apresentaram valores de CIM e CBM próximos de 1,04 mg/mL para *E.coli* e 1,25 mg/mL para *Salmonella* Typhi (Tabela 3), indicando a seletividade do nitrito, que são mais eficazes em pH ácido e em organismos com vias metabólicas específicas para o nitrito (Guo *et al.*, 2024).

O sorbato de potássio exibiu atividade generalizada, com CIM de 1,25 mg/ mL para *E.coli* e 10 mg/ mL para as demais cepas, gram-positivas e gram-negativas. Nota-se que o sorbato demonstrou um CBM de 2,5 mg/ mL contra *E.coli*, caracterizando um padrão de agente bactericida eficaz contra bactérias gram-negativas maior do que o nitrito de sódio (Duda-Chodak; Tarko; Petka-Poniatowska, 2023).

Para o controle antibiótico foi utilizado a Estreptomicina, um aminoglicosídeo que inibe a síntese proteica. Sendo um agente de amplo espectro a estreptomicina apresentou alta potência contra diversas cepas. Contra as bactérias gram-positivas e a *Salmonella* Typhi (Gram-negativa), o CBM constante de 0,31 mg/ mL e CIM constante de 0,02 mg/mL para as bactérias gram-positivas e variação nos valores de CIM para as bactérias gram-negativas (Tabela 3), o que podemos atribuir a um mecanismo de resistência intrínseca a estreptomicina conferida pelo gene *strAB* presentes nas bactérias gram-negativas (Wangkheimayum *et al.*, 2022).

Os controles positivos confirmam a viabilidade das cepas bacterianas utilizadas, além de acentuar a suscetibilidade do extrato de lúpulo de Columbus, com CIM de 0,04 mg/ mL contra *S. aureus* (Tabela 3) que foi comparável em eficácia com o nitrito de sódio (1,25 mg mL) e apresentou valores de CIM menores que o sorbato de potássio (10 mg/mL), no mesmo ensaio de inibição contra a

bactéria gram-positiva. Essa comparação ressalta o potencial do extrato de lúpulo como agente antimicrobiano seletivo e eficaz.

Neste estudo, também foi avaliado a ação antimicrobiana dos cones de *H. lupulus* em isolados de mastite, conforme a Tabela 4.

Tabela 4. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do extrato etanólico dos cones de *Humulus lupulus* L. contra isolados Gram-positivos de mastite.

Bactérias	Extrato Etanólico dos Cones (mg/mL)			
	Cascade	Columbus	Comet	Nugget
	CIM/CBM			
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	>10	>10	>10	>10
	>10	>10	>10	>10
14-13 <i>Staphylococcus</i> spp	0,04 ± 0,00 Aa	0,63 ± 0,00 Da	0,16 ± 0,00 Ba	0,31 ± 0,00 Ca
	1,25 ± 0,00 Ab	10 ± 0,00 Ca	10 ± 0,00 Ca	2,5 ± 0,00 Ba
15-17 <i>Staphylococcus</i> spp	10 ± 0,00 Ba	>10	>10	>10
	10 ± 0,00 Bb	>10	>10	>10

Os resultados representam as médias ± desvio padrão. Letras representam diferenças significativas. Letras maiúsculas para análise do CIM em linha, letras maiúsculas em negrito para análise do CBM em linha, pelo teste de Tukey ($\leq 0,05$). Letras minúsculas para análise do CIM em coluna, letras minúsculas em negrito para análise do CBM em linha, pelo teste de Tukey ($\leq 0,05$).

Continuação tabela 4

Bactérias	Extrato Etanólico dos Cones (mg/mL)			
	Cascade	Columbus	Comet	Nugget
	CIM/CBM			
<i>Escherichia coli</i>	10 ± 0,00 Bc	>10	>10	>10
	> 10	>10	10 ± 0,00 Bc	10 ± 0,00 Ba
24-05 Bactérias Gram-Negativas (BGN)	>10	-	-	0,08 ± 0,00 Aa
	>10	>10	>10	10 ± 0,00 Ca
25-07 BGN Não Fermentadores	-	>10	>10	>10
	>10	>10	2,5 ± 0,00 Ab	>10
26-09 Bactérias Gram-Negativas (BGN)	>10	>10	10 ± 0,00 Aa	10 ± 0,00 Ab
	2,5 ± 0,00 Bb	>10	> 10	>10
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	-	-	-
	>10	>10	10 ± 0,00 Ac	10 ± 0,00 Aa

Os resultados representam as médias ± desvio padrão. Letras representam diferenças significativas. Letras maiúsculas para análise do CIM em linha, letras maiúsculas em negrito para análise do CBM em linha, pelo teste de Tukey ($\leq 0,05$). Letras minúsculas para análise do CIM em coluna, letras minúsculas em negrito para análise do CBM em linha, pelo teste de Tukey ($\leq 0,05$). O símbolo - indica ausência de crescimento bacteriano.

O aumento de cepas bacterianas resistentes a antibióticos são um desafio para o tratamento de doenças infecciosas como a mastite, cepas de *Staphylococcus epidermidis* resistentes à metilina (MRSE), são cada vez mais prevalentes o que leva a uma multirresistência (MDR) e limita as opções de tratamentos (Mirzaei *et al.*, 2022).

Os resultados de CIM e CBM do extrato etanólico dos cones de lúpulo contra isolados clínicos da mastite demonstram atividade antimicrobiana seletiva (Tabela 4) e com variação de potência que revelam a complexidade dos mecanismos de resistência isolados de campo. O resultado mais promissor foi contra o isolado clínico *Staphylococcus* spp. (Tabela 4), atingindo alta suscetibilidade para todas as variedades, destacando a variedade Cascade que superou a atividade antimicrobiana da Columbus nos demais testes, apresentando o menor CIM de 0,04 mg/ mL, igualando ao resultado mais baixo da Tabela 3 e reforçando o potencial elevado como agente bacteriostático do extrato.

Para a ação bactericida a variedade Cascade também apresenta o CIM mais baixo contra o isolado *Staphylococcus* spp., de 1,25 mg/ mL. As variedades Nugget (2,5 mg/ mL), Columbus e Comet (10 mg/ mL) também apresentaram CBM, sugerindo que todas as variedades podem ser agentes bactericidas contra isolados gram-positivos sensíveis. Relacionando com os dados obtidos no estudo de Kolenc *et al.* (2022), esses achados sugerem que os compostos xanthohumol, cohumulona, n+adhumulona, colupulona e n+adlupulona são os possíveis responsáveis pelas características significativas da atividade antimicrobiana dos extratos de lúpulo frente a *Staphylococcus aureus*.

S. aureus é considerado o maior agente causador de mastite mundial, tanto nas formas clínicas quanto subclínicas. Variando sua prevalência geograficamente, em regiões do sudeste da Austrália a *S. aureus* corresponde a 10,6% dos isolados clínicos e 29,1% dos casos subclínicos de mastite (Dyson *et al.*, 2022). Na região central da Etiópia, registrou-se uma prevalência de 73,7% dos casos de mastite causados por *S. aureus* (Fesseha *et al.*, 2021). Na China, os casos clínicos de mastite por *S. aureus* variam de 10% a 66,6%, segundo estudos de manejo do rebanho e práticas de diagnóstico (Wang *et al.*, 2022).

Contrapondo a cepa ATCC 29213 (Tabela 3), a cepa de *S. aureus* ATCC 25923 demonstrou resistência nos testes de CIM e CBM (>10 mg/ mL), assim como outro isolado de *Staphylococcus* spp., que foi resistente a maioria dos extratos. Essa

discordância sugere que a presença de mecanismos de efluxo ou outras barreiras enzimáticas e mutações genéticas que restringem o contato dos compostos antimicrobianos, algo recorrente em isolados clínicos devido ao histórico de exposição a antibióticos sintéticos (Mlynarczyk-Bonikowska *et al.*, 2022).

A inatividade de ação contra as gram-negativas (Tabela 4) se repete neste ensaio, visto que o extrato dos cones não inibiu a *E. coli* (CIM >10 mg/ mL). Entretanto, a variedade Nugget foi uma exceção considerável apresentando um CIM de 0,08 mg/ mL contra isolados não identificados de bactérias gram-negativas (24-05), a concentração foi significativamente baixa, porém, o CBM apresentou valores de 10 mg/mL e > 10 mg/ mL para a mesma cepa, o que sugere um padrão de morte celular rápida somente observado em concentrações elevadas, indicando uma janela terapêutica complexa.

Os melhores resultados (Tabela 4), enfatizam que os extratos de lúpulo, com destaque para a variedade Cascade, são promissores no controle de isolados gram-positivos de mastite. Ainda assim, a variação de suscetibilidade observada entre os isolados destaca a necessidade de estudos mais minuciosos sobre os mecanismos de resistência induzidos por exposição prévia em campo.

De forma geral, o extrato de lúpulo apresentou atividades antimicrobianas contra cepas de *S. aureus*, *B. cereus* e *E. cloacae*, incluindo os isolados clínicos de bactérias causadoras de mastite. Sintetizando uma potência contra bactérias gram-positivas e a resistência das gram-negativas, esses resultados podem ser atribuídos ao mecanismo de ação dos compostos metabólitos dos cones de *Humulus lupulus*: os α -ácidos e β -ácidos, flavonóides e ácidos fenólicos (Sanz *et al.*, 2019). A porção majoritária dos α -ácidos são a cohumulona, humulona e adhumulona, que na literatura são apontados como participantes na ação antimicrobiana principalmente contra bactérias gram-positivas (Kramer *et al.*, 2015). Os β -ácidos são compostos majoritariamente por colupulona, lupulona e adlupulona e constituem cerca de 10% do peso dos cones secos, sendo também parte do grupo de inibição das bactérias (Formato *et al.*, 2013).

Conforme o estudo conduzido por Arruda *et al.* (2021), no qual foi realizado um ensaio de suscetibilidade bacteriana utilizando o método de difusão em ágar, verificou-se que a variedade Columbus exibiu atividade antibacteriana comparável aos antibióticos de controles testados frente a *S. aureus*, com uma zona de inibição de 35,5 mm para a variedade, já para a tetraciclina foi de 38,8 mm e para a

ampicilina de 40,8 mm. Entretanto, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *L. monocytogenes* demonstraram menor sensibilidade aos extratos hidroetanólicos de lúpulo, com zonas de inibição em apenas quatro das dez variedades avaliadas.

Outros compostos fenólicos do lúpulo, como a catequina, também são apontados como responsáveis pela atividade antimicrobiana (Gomes *et al.*, 2018). Os agentes antimicrobianos presentes no lúpulo apresentam natureza predominantemente hidrofóbica, característica que favorece sua difusão através da parede celular bacteriana e subsequente interação com a membrana citoplasmática, culminando em danos estruturais significativos (Rozalski *et al.*, 2013).

A eficácia observada neste estudo é o resultado da interação do alvo e do composto fitoquímico potente de caráter lipofílico que atinge diretamente o motor energético da célula. Nas bactérias gram-negativas essa suscetibilidade é reduzida, esse mecanismo é relacionado a presença de fosfatídeos séricos nos fosfolipídios que constituem a membrana externa, os quais atuam como uma barreira adicional a entrada dos compostos bioativos (Fahle; Bereswill; Heimesaat, 2022).

A exceção encontrada nos valores da *E. cloacae* (Tabela 3) e a ação inibitória da variedade Nugget contra isolados não identificados gram-negativos (Tabela 4) podem indicar danos estruturais na membrana externa das cepas ou dos mecanismos enzimáticos que confere permeabilidade aos fitoativos do lúpulo. Os resultados deste estudo podem servir como base para reforçar o valor dos extratos e trazer destaque para o potencial do lúpulo para aplicações antimicrobianas.

Atualmente existe uma diferença metodológica entre os estudos envolvendo os extratos bruto de *H. lupulus*, unidades de concentração e densidades de inóculo distintos, meios de cultura e parâmetros de determinação da concentração inibitória mínima (CIM) que dificultam a padronização das análises dos resultados dos ensaios microbianos (Kiofentzoglou *et al.*, 2025).

É notória a necessidade pela investigação de novas substâncias com atividade antimicrobiana, porém na literatura ainda existe uma lacuna na padronização quanto à categorização da potência e eficácia biológica desses compostos. Para fundamentar as análises dos dados obtidos, foi utilizada a classificação proposta por Ahmad, Van Vuuren e Viljoen (2014), que classificaram os valores de CIM em três níveis de potência: significativa (CIM menor ou igual a 2 mg/mL), moderada (CIM entre 2 e 4 mg/mL) e fraca (CIM maior ou igual a 4 mg/mL). Diante disso, a atividade dos extratos das variedades Cascade e Comet

frente aos isolados de *Staphylococcus* spp., cujos valores foram de 0,04 mg/mL e 0,16 mg/mL, respectivamente, enquadram-se na classificação de potência significativa.

4. CONCLUSÕES

A atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos das folhas e cones (Cascade, Columbus, Comet e Nugget) testados contra bactérias padrões e isolados clínicos causadores de mastite apresentaram resultados que evidenciam que o extrato de lúpulo possui potencial antimicrobiano e bactericida considerável, com atividade marcante e consistente contra o grupo de bactérias Gram-positivas (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. cereus* e *L. monocytogenes*). Contudo, as bactérias Gram-negativas (*E. coli*, *S. Typhi*, *P. aeruginosa* e *E. cloacae*) apresentaram maior resistência a ação dos extratos, a determinada seletividade propõe que os compostos bioativos do lúpulo exibem eficácia relevante contra patógenos de mastite (majoritariamente Gram-positivos), legitimando o potencial do extrato etanólico das variedades escolhidas para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para o tratamento e controle da doença.

5. AGRADECIMENTOS

A autora agradece a Universidade Paranaense - UNIPAR, Universidade Estadual de Maringá - UEM, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento e Tecnológico (CNPq) e Fundação Araucária por fomentar o desenvolvimento científico.

REFERÊNCIAS

- ABRAM, V. *et al.* A comparison of antioxidant and antimicrobial activity between hop leaves and hop cones. **Industrial Crops & Products**, v. 64, p. 124-134, 2015.
- AHMAD, A.; VAN VUUREN, S.; VILJOEN, A. Unravelling the complex antimicrobial interactions of essential oils—the case of *Thymus vulgaris* (Thyme). **Molecules**, v. 19, n. 3, p. 2896-2910, 2014.
- ARRUDA, T. R. *et al.* A new perspective of a well-recognized raw material: Phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities and α - and β -acids profile of Brazilian hop (*Humulus lupulus* L.) extracts. **Lwt**, v. 141, p. 110905, 2021.
- ASTRAY, G. *et al.* *Humulus lupulus* L. as a natural source of functional biomolecules. **Applied Sciences**, v. 10, n. 15, p. 5074, 2020.
- BECK, H. E. *et al.* Present and future Köppen-Geiger climate classification maps at 1-km resolution. **Scientific Data**, v. 5, n. 1, p. 1-12, 2018.
- CHAACHOUAY, N.; ZIDANE, L. An ethnoveterinary investigation into medicinal and aromatic plants used to treat livestock diseases by the local communities of the Rif, north of Morocco. 2022.
- CLSI - CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically, 7th. Approved standard M7-A10, 2015.
- COBIRKA, M.; TANCIN, V.; SLAMA, P. Epidemiology and classification of mastitis. **Animals**, v. 10, n. 12, p. 2212, 2020.
- CONTIN, D. R. *et al.* Exploring the tropical acclimation of European and American hop cultivars (*Humulus lupulus* L.): Focus on physiology, productivity, and chemical composition. **European Journal of Agronomy**, v. 151, p. 126990, 2023.
- DABBOUS-WACH, A. *et al.* Quantification of α -Acids, β -Acids, and Phenolic Compounds in Corsican Hops Using LC–MS/MS and Metabolomic Approach Through Molecular Networks. **Phytochemical Analysis**, 2024.

DEBRUYN, Ella et al. Alternative approaches for bovine mastitis treatment: A critical review of emerging strategies, their effectiveness and limitations. **Research in Veterinary Science**, v. 185, p. 105557, 2025.

DUARTE, L. M. *et al.* Determination of α - and β -acids in hops by liquid chromatography or electromigration techniques: A critical review. **Food Chemistry**, v. 397, p. 133671, 2022.

DUDA-CHODAK, A.; TARKO, T.; PETKA-PONIATOWSKA, K. Antimicrobial compounds in food packaging. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 3, p. 2457, 2023.

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

DYSON, R. *et al.* A survey of mastitis pathogens including antimicrobial susceptibility in southeastern Australian dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v. 105, n. 2, p. 1504-1518, 2022.

FAHLE, A.; BERESWILL, S.; HEIMESAAT, M. M. Antibacterial effects of biologically active ingredients in hop provide promising options to fight infections by pathogens including multi-drug-resistant bacteria. **European Journal of Microbiology & Immunology**, v. 12, n. 1, p. 22-30, 2022.

FERREIRA, D. F. Sisvar: A Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência & Agrotecnologia**, v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014.

FESSEHA, H. *et al.* Study on prevalence of bovine mastitis and associated risk factors in dairy farms of Modjo town and suburbs, central Oromia, Ethiopia. **Veterinary Medicine: Research & Reports**, p. 271-283, 2021.

FIDALSKI, J.; TORMENA, C. A.; ALVES, S. J. Intervalo hídrico ótimo de um Latossolo Vermelho distrófico, após o primeiro período de pastejo contínuo de *Brachiaria ruziziensis*, em sistema integração lavoura-pecuária. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 37, p. 775-783, 2013.

FORMATO, A. *et al.* Supercritical fluid extraction of α - and β -acids from hops compared to cyclically pressurized solid-liquid extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 84, p. 113-120, 2013.

- GOMES, F. M. S. *et al.* Evaluation of antibacterial and modifying action of catechin antibiotics in resistant strains. **Microbial Pathogenesis**, v. 115, p. 175-178, 2018.
- GUO, J. *et al.* Comparative Study of the Antibacterial Effects of S-Nitroso-N-acetylcysteine and Sodium Nitrite against *Escherichia coli* and Their Application in Beef Sausages. **Foods**, v. 13, n. 15, p. 2383, 2024.
- IVANOV, M. *et al.* Polyphenols as inhibitors of antibiotic-resistant bacteria—Mechanisms underlying rutin interference with bacterial virulence. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 3, p. 385, 2022.
- JACQUIN, J. *et al.* Hop (*Humulus lupulus* L.) specialized metabolites: Extraction, purification, characterization in different plant parts and in vitro evaluation of anti-oomycete activities against *Phytophthora infestans*. **Agronomy**, v. 12, n. 11, p. 2826, 2022.
- KIOFENTZOGLOU, D. *et al.* Antimicrobial Activity of Chemical Hop (*Humulus lupulus*) Compounds: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Applied Sciences**, v. 15, n. 14, p. 7806, 2025.
- KOLENC, Z. *et al.* Antimicrobial properties of different hop (*Humulus lupulus*) genotypes. **Plants**, v. 12, n. 1, p. 120, 2022.
- KOVAČEVIĆ, Z. *et al.* Natural agents against bovine mastitis pathogens. **Antibiotics**, v. 10, n. 2, p. 205, 2021.
- KRAMER, B. *et al.* Antimicrobial activity of hop extracts against foodborne pathogens for meat applications. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, n. 3, p. 648-657, 2015.
- LAXMINARAYAN, R. *et al.* Antibiotic resistance—the need for global solutions. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 12, p. 1057-1098, 2013.
- LELA, L. *et al.* Nanotechnological exploitation of the antioxidant potential of *Humulus lupulus* L. extract. **Food Chemistry**, v. 393, p. 133401, 2022.
- MIRZAEI, R. *et al.* Highly synergistic effects of melittin with vancomycin and rifampin against vancomycin and rifampin resistant *Staphylococcus epidermidis*. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 869650, 2022.

- MLYNARCZYK-BONIKOWSKA, B. *et al.* Molecular mechanisms of drug resistance in *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 15, p. 8088, 2022.
- NANCE, M. R.; SETZER, W. N. Volatile components of aroma hops (*Humulus lupulus* L.) commonly used in beer brewing. **Journal of Brewing & Distilling**, v. 2, n. 2, p. 16-22, 2011.
- NITSCHKE, P. R. *et al.* Atlas climático do estado do Paraná. **Londrina: Instituto Agrônômico do Paraná**, 2019.
- PEEL, M. C.; FINLAYSON, B. L.; MCMAHON, T. A. Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. **Hydrology & Earth System Sciences**, v. 11, n. 5, p. 1633-1644, 2007.
- RODRIGUES, T. S. *et al.* Métodos de secagem e rendimento dos extratos de folhas de *Plectranthus barbatus* (boldo-da-terra) e *P. ornatus* (boldo-miúdo). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, p. 587-590, 2011.
- ROEHRER, S. *et al.* Analyzing bioactive effects of the minor hop compound xanthohumol C on human breast cancer cells using quantitative proteomics. **PLoS One**, v. 14, n. 3, p. e0213469, 2019.
- ROZALSKI, M. *et al.* Antiadherent and antibiofilm activity of *Humulus lupulus* L. derived products: New pharmacological properties. **BioMed Research International**, v. 2013, n. 1, p. 101089, 2013.
- SANZ, V. *et al.* What is new on the hop extraction?. **Trends in Food Science & Technology**, v. 93, p. 12-22, 2019.
- SCHNEIDER, Y. K. Bacterial natural product drug discovery for new antibiotics: strategies for tackling the problem of antibiotic resistance by efficient bioprospecting. **Antibiotics**, v. 10, n. 7, p. 842, 2021.
- SILVA, G. C. C. *et al.* Phytochemical Profile, Antioxidant Capacity, and Photoprotective Potential of Brazilian *Humulus lupulus*. **Pharmaceuticals**, v. 18, n. 8, p. 1229, 2025.
- SPÓSITO, M. B. *et al.* A cultura do lúpulo. **Série Produtor Rural**, v. 68, 2019.
- VAOU, N. *et al.* Towards advances in medicinal plant antimicrobial activity: A review study on challenges and future perspectives. **Microorganisms**, v. 9, n. 10, p. 2041, 2021.

VEIKO, A. G. *et al.* Antimicrobial activity of quercetin, naringenin and catechin: Flavonoids inhibit *Staphylococcus aureus*-induced hemolysis and modify membranes of bacteria and erythrocytes. **Molecules**, v. 28, n. 3, p. 1252, 2023.

WANG, K. *et al.* The prevalence of bovine mastitis-associated *Staphylococcus aureus* in China and its antimicrobial resistance rate: A meta-analysis. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 9, p. 1006676, 2022.

WANG, L. *et al.* Quercetin protects rats from catheter-related *Staphylococcus aureus* infections by inhibiting coagulase activity. **Journal of Cellular & Molecular Medicine**, v. 23, n. 7, p. 4808-4818, 2019.

WANGKHEIMAYUM, J. *et al.* *Escherichia coli* harbouring strAB with reduced susceptibility towards gentamicin and amikacin: a single centre study from India. **Access Microbiology**, v. 4, n. 10, p. 000446, 2022.

YAN, D. *et al.* Assessment of the phytochemical profiles of novel hop (*Humulus lupulus* L.) cultivars: A potential route to beer crafting. **Food Chemistry**, v. 275, p. 15-23, 2019.

ZHANG, Y. *et al.* Nitrite and nitrate in meat processing: Functions and alternatives. **Current Research in Food Science**, v. 6, p. 100470, 2023.

ZHANG, Z. *et al.* Research progress on the antibacterial activity of natural flavonoids. **Antibiotics**, v. 14, n. 4, p. 334, 2025.