

## Avaliação da atividade antibiótica do extrato de lúpulo (*Humulus lupulus*) sobre diferentes espécies de *Candida*

Larissa Ferreira Sena<sup>1</sup>, Sabrina Hilário Cardoso<sup>1</sup>, Renata Silva do Prado<sup>1</sup>, Rodrigo Scaliante de Moura<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro Universitário de Anápolis – UniEVANGÉLICA – Curso de Farmácia. Av. Universitária Km 3,5, Cidade Universitária - Anápolis/GO, 75083-515. \*Autor para correspondência: larissasena@hotmail.com

**RESUMO:** O lúpulo (*Humulus lupulus*) é uma planta da família Cannabinaceae, cujas inflorescências são amplamente usadas para preservar cervejas e são responsáveis pelo aroma e sabor característicos da bebida. Além disso já é amplamente utilizada como fitoterápico em medicina tradicional no tratamento da ansiedade, insônia, perda de peso e no controle de desconfortos menstruais. Sua atividade antibiótica também é relatada, porém com resultados contraditórios. O presente estudo avaliou a capacidade inibitória do extrato de *H. lupulus* sobre diferentes espécies de *Candida* em testes padronizados. O extrato do *H. lupulus* foi obtido via extração hidro-alcoólica, e a influência deste sobre o crescimento do fungo foi avaliada via extração hidro-alcoólica, e a influência deste sobre o crescimento do fungo foi avaliada via experimentos de concentração inibitória mínima (CIM), bem como teste de sensibilidade em placa e teste de sensibilidade utilizando disco de difusão. Além disso, foi realizado teste de sinergismo entre o extrato e combinações de antibióticos como cetoconazol e cotrimoxazol. Diante dos testes realizados, se obteve como resultado que o lúpulo não inibe o crescimento de espécies de *Candida*, além disso, apresenta efeito antagonista sobre o cetoconazol que é indicado para o tratamento de certas infecções graves causadas por fungos. Também não apresentou efeito sinérgico ou antagônico para cotrimaxazol.

**Palavras chave:** *Candida*, Lúpulo, Fitoterapia

**ABSTRACT: Evaluation of antibiotic activity of hops (*Humulus lupulus*) extract on different species of *Candida*.** Hop (*Humulus lupulus*) is a plant from the Cannabinaceae family, which inflorescences are widely used to preserve beers and are responsible for the characteristic flavor and smell of the beverage. It is also used as an herbal remedy to treat anxiety, insomnia, loss of weight or in the control of menstrual discomforts. Its antibiotic activity is also reported, but with controversial results. The present study evaluated the inhibitory capability of hops extract on *Candida* species in standardized tests. The hops extract was obtained by hydro-alcoholic extraction and the influence on the fungus growing was evaluated by experiments of minimum inhibitory concentration (MIC), as well as with sensibility on plate test and disc diffusion method. Moreover, we performed a synergism test between the hops extract and antifungal drugs such as cetoconazol and cotrimoxazol. In face of results, we conclude that hops cannot constrain the growing of *Candida* species, and besides that, it presents an antagonist effect on cetoconazol, which is used to treat severe fungal infections. It also did not present any synergic or antagonist effect on cotrimaxazol.

**Keywords:** *Candida*, Hops, Herbal therapy.

### INTRODUÇÃO

O lúpulo é uma planta da família Cannabinaceae, consistindo em três espécies *Humulus lupulus*, *H. japonicus* e *H. yunnanensis* (Small 1978; Royle 1992). As inflorescências são amplamente usadas para preservar cervejas e são responsáveis pelo aroma e sabor característicos da bebida. Além do seu uso no preparo da cerveja, preparações a base de lúpulo são comercializadas,

principalmente em segmentos comerciais de alimentação saudável, visando o combate da obesidade, ansiedade e insônia. Em concordância com o crescente interesse em se avaliar os benefícios de plantas reconhecidas como medicinais por tradições e costumes, o lúpulo tem sido bastante estudado principalmente como ansiolítico e sedativo, porém com resultados contraditórios (Zanoli et al. 2007; Sumiyoshi e Kimura 2013).

Uma possível atividade estrogênica do extrato de lúpulo também foi avaliada, incluindo um potencial quimioterápico ou quimioprofilaxia contra o câncer. Nestes estudos, atenção especial foi dada para os compostos 8-prenilnaringenina, que está entre os mais potentes fitoestrógenos já conhecidos e o xanthohumol, que apresentou uma ampla capacidade inibitória de tumores de várias origens (Gerhäuser 2005a; Saugspier et al. 2012). Além disso, a atividade estrogênica da planta também vem sendo estudada como ferramenta de alívio de sintomas da menopausa (Chadwick et al. 2006; Keller et al. 2013; Aghamiri et al. 2016).

A atividade antimicrobiana do lúpulo é reconhecida desde 1888, e a maioria dos estudos envolvendo a capacidade antimicrobiana dos compostos presentes no lúpulo avaliam este papel sobre bactérias que prejudicam a produção da cerveja, sem grande foco em bactérias de interesse médico. Por exemplo, é bem conhecido o papel dos iso- $\alpha$ -ácidos isolados da planta em inibir cepas de *Pediococcus* e *Lactobacillus*, que são responsáveis pela maioria dos casos de degradação de lotes de cerveja. Conforme revisado por Gerhäuser (2005a, b), o xanthohumol apresenta um amplo espectro de atividade inibitória sobre bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*), vírus (citomegalovírus, herpes simplex, vírus da imunodeficiência humana – HIV tipo 1 e 2), fungos (*Trichophyton spp.*) e o protozoário causador da malária (*Plasmodium falciparum*). Acredita-se que a atividade dos ácidos amargos ( $\alpha$ -ácidos e  $\beta$ -ácidos) presentes no extrato de lúpulo sejam responsáveis pelo rompimento da membrana de bactérias Gram positivas, como *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Mycobacterium* e *Streptomyces* (Teuber e Schmalreck 1973; Gerhäuser 2005b; Bocquet, Sahpaz e Rivière 2018; Nionelli et al. 2018).

Estudos antigos demonstraram capacidade inibidora de componentes presentes no lúpulo sobre o fungo *Candida albicans* porém o mecanismo responsável por esta inibição permanece em investigação (Mizobuchi e Sato 1985). Representantes do gênero *Candida* são classificados como microrganismo oportunistas. A espécie mais encontrada em isolados clínicos é a *Candida albicans* conforme comprovado por estudos, sendo responsável por cerca de 80% das vulvovaginites, e é o principal patógeno responsável pela maioria das infecções nosocomiais (Nowack et al. 2009; Karkowska-Kuleta, Rapala-Kozik e Kozik 2009), embora outras espécies têm sua importância cada vez maior como a *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* (Sá et al. 2014).

A infecção por *Candida* é mais comum entre pacientes que passam longos períodos internados, como pacientes em que há necessidade do uso diário de cateteres, sondas, ou algum tipo de tratamento via parenteral (Oliveira et al. 2001). Segundo Costa (2009), 61% dos pacientes que usam cateter apresentaram infecção por *C. albicans*. A infecção é especialmente preocupante em pacientes imunossuprimidos, seja pelo uso de drogas com este efeito ou pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV).

Para o tratamento de candidíase as principais classes de medicamentos utilizados são os azóis (triazóis), os poliênicos (anfotericina B), e as equinocadinas (anidulafungina) (Demitto et al. 2012). Antifúngicos como cetoconazol, miconazol, fluconazol e itraconazol se sobressaem no tratamento da candidíase por possuírem alta atividade antifúngica. Porém estudos recentes mostram o aparecimento de cepas de *C. albicans* resistentes ao itraconazol (Taira e Chang 2011; Pedroso e Barbosa 2009).

Diante do surgimento de leveduras resistentes, os extratos vegetais com atividade antimicrobiana surgem como uma alternativa para o tratamento de infecções fúngicas oportunistas, como a candidíase (Mardegan et al. 2006). A atividade antifúngica sobre *C. albicans* também foi observada nos óleos essenciais extraídos do manjeriço, palmaros e tomilho (Almeida et al. 2012). O presente projeto visa avaliar a atividade antifúngica do lúpulo sobre espécies de *Candida albicans* de forma a descrever a possibilidade de desenvolvimento de um novo fitoterápico para o controle da infecção.

## METODOLOGIA

### Desenho

Foi realizado um estudo de abordagem indutiva, quali-quantitativo, com procedimento comparativo estatístico e técnica de documentação direta em laboratório.

### Obtenção dos extratos de *H. lupulus*

Foram obtidos *pellets* de *H. lupulus* disponíveis comercialmente. Estes *pellets* são preparados pela prensagem das inflorescências do lúpulo e utilizados no preparo de cervejas. Os *pellets* de *H. lupulus* foram maceradas, e após esse processo, armazenados em frasco âmbar contendo metanol sob refrigeração, durante sete dias. Posteriormente, essa amostra foi filtrada e colocada em um agitador magnético com termostato para a evaporação do solvente. O extrato resultante foi armazenado em um frasco âmbar ao abrigo da luz, à 4 °C.

### Cultivo e manutenção do fungo

As espécies *C. albicans* (ATCC 14053), *C. tropicalis* (ATCC 96745) e *C. parapsilosis* (ATCC 22019) foram cultivadas em meio Ágar Saboraud Dextrose (Peptona 10 g/l; Dextrose 40 g/l; Ágar 15 g/l) meio recomendado para o cultivo de leveduras e fungos em geral. Após a solidificação do meio, os fungos foram mantidos em estufa a 36 °C por sete dias, e então submetidos à experimentação.

### Teste de Sensibilidade em placas

Para o teste de sensibilidade, células leveduriformes das diferentes espécies de *Candida* com sete dias de crescimento em ágar Saboraud Dextrose, foram colocadas em meio Nutriente sólido (Extrato de Bife 1 g/l; Extrato de Levedura 2 g/l; Peptona 5 g/l; Cloreto de Sódio 5 g/l; Agar 15 g/l) suplementado com extrato de *H. lupulus* em diferentes concentrações. A concentração de células utilizada foi 10<sup>5</sup> UFC. Placas de controle com drogas conhecidas foram incluídas. As placas foram incubadas por sete dias a 36 °C antes de serem fotografadas.

### Teste de sensibilidade por disco de difusão

A potencial atividade microbiológica do extrato de *H. lupulus* foi verificada utilizando-se discos de difusão em Nutriente sólido. Discos de papel estéreis (diâmetro de 6 mm), foram embebidos previamente no extrato, em diferentes concentrações. Posteriormente, foram inoculados 1,5x10<sup>8</sup> células/ml de *Candida sp.* em placas de meio Nutriente sólido, e em seguida, os discos foram retirados dos tubos com uma pinça estéril, e colocados sobre as placas contendo o meio. As placas foram incubadas em estufa, a 36 °C, por 7 dias. O número de células inoculado no experimento foi contado através de câmara de Neubauer. Depois de crescidas não foi realizada nova contagem, uma vez que o teste é qualitativo e se resume na medição do halo de inibição.

### Teste de sinergismo

Uma potencial atividade sinérgica do extrato de *H. lupulus* com antifúngicos cetoconazol e cotrimaxol foi avaliada utilizando discos de papel estéreis (diâmetro de 6 mm) embebidos previamente no extrato, em diferentes concentrações. Posteriormente, foram inoculados 1,5x10<sup>8</sup> células/

ml de *Candida sp.* em placas de ágar nutriente acrescido de cetoconazol e cotrimaxol. Em seguida, os discos foram retirados dos tubos com uma pinça estéril, e colocados sobre as placas contendo o meio. As placas foram incubadas em estufa, a 36 °C, por 7 dias.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Obtenção de extrato de *H. lupulus*

A partir da maceração da inflorescência de *H. lupulus* simultaneamente com metal, e posteriormente filtrado, obtivemos o rendimento do extrato pela rotaevaporação, calculando-se a porcentagem de rendimento bruto. Como mostra na tabela 1.

Desse modo, utilizando 71,93 g da amostra de *H. lupulus* diluídos em 800 ml de solvente metanólico e posteriormente rotoevaporado para eliminar o solvente, se obteve um total de 34,2 g de extrato. O percentual de rendimento do extrato metanólico foi de 47,5%. O percentual de rendimento da extração com o uso de metanol foi maior quando comparado com os demais solventes. Em estudo utilizando o etanol como solvente, Tabata et al. (1997) obteve rendimento que variou entre 4,5% e 12,9%. No estudo de Zhao et al. (2003) o extrato de lúpulo apresentou um rendimento de 13,1% sendo obtido com acetato de etila.

Conforme descrito por Mizobuchi e Sato (1984) o extrato metanólico de lúpulo contém lupulonas e humulonas como constituintes principais. O papel antifúngico sobre *C. albicans* destas substâncias está sendo avaliado no presente estudo.

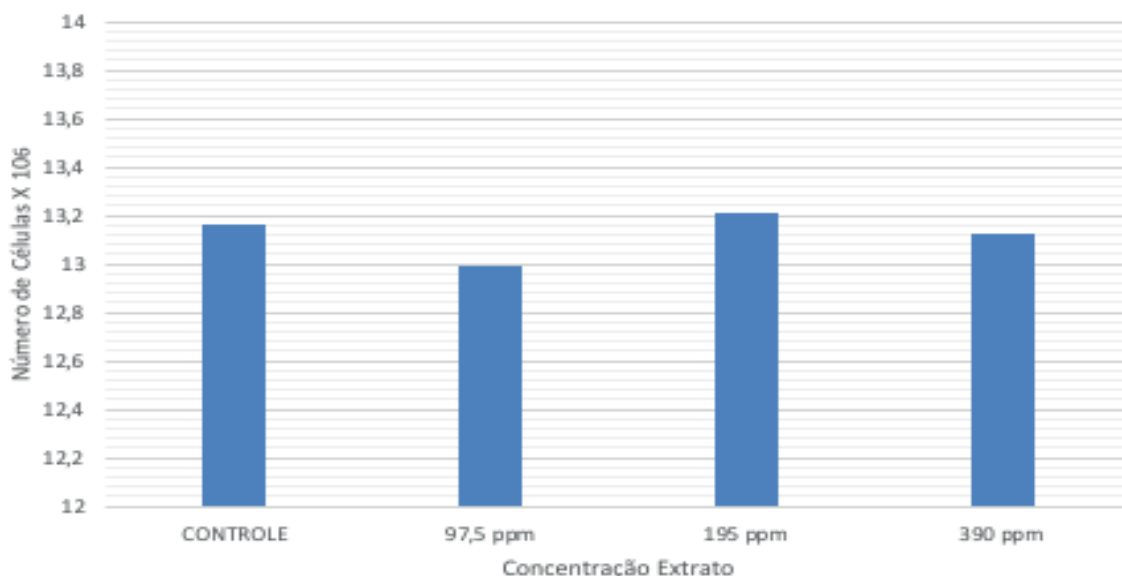
### Atividade antifúngica do extrato de lúpulo.

A capacidade de diferentes concentrações do extrato de *H. lupulus* em inibir o crescimento do fungo foi analisada por diferentes métodos. Após cultivo a 37 °C por 7 dias as colônias crescidas foram contadas pela densidade óptica do caldo de cultura observado em espectrofotômetro, e os resultados encontrados com o experimento utilizando *Candida albicans* podem ser observados na Figura 1. Os demais fungos testados apresentaram resultados semelhantes. Não houve inibição do crescimento do fungo pelas diferentes concentrações do extrato de *H. lupulus* (variação de 13 x 10<sup>6</sup> a 13,2 x 10<sup>6</sup> células), em comparação ao controle (cerca de 13,2 x 10<sup>6</sup> células).

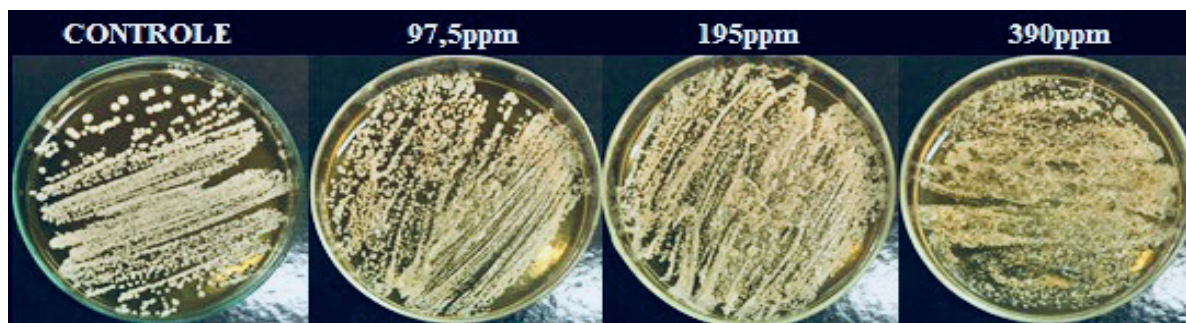
TABELA 1. Obtenção de extrato de *Humulus lupulus*

Espécie	Extrato	Massa (g)	EM (g)	Rendimento (%)
<i>H. lupulus</i>	Inflorescência	71,93 g	34,23 g	47,5%

\*EM: Extrato metanólico



**FIGURA 1.** Crescimento de *Candida albicans* em caldo nutriente na presença das concentrações testadas 97,5 ppm, 195 ppm, e 390 ppm de extrato de *Humulus lupulus*.



**FIGURA 2.** Teste de sensibilidade em placas. Crescimento de *Candida albicans* em meio ágar nutriente suplementado com extrato metanólico de inflorescência de *Humulus lupulus* nas concentrações de 97,5 ppm, 195 ppm, e 390 ppm respectivamente.

O teste de sensibilidade em placa é um teste qualitativo onde é possível observar o crescimento das colônias de maneira semelhante tanto na placa controle quanto naquelas tratadas com diferentes concentrações do extrato de lúpulo. Portanto não foi observada capacidade inibitória sobre o crescimento do fungo *C. albicans* pelo extrato de *H. lupulus*.

Em seguida, foram inoculadas  $10^6$  células do fungo em placa Agar Nutriente sólido. Discos de papel estéreis foram imersos no extrato metanólico de *H. lupulus* em diferentes concentrações e adicionados ao meio de cultura, para testar a atividade inibitória do extrato sobre o fungo. Conforme observado na Figura 3, os resultados deste teste corroboram com os testes de sensibilidade em placa, comprovando que não há atividade inibitória do extrato metanólico de *H. lupulus*.

Mizobuchi e Sato (1985) relatou forte atividade antifúngica da substância 3-isopentenilflorisovalerofenone isolada do extrato



**FIGURA 3.** Teste feito com discos de difusão, imerso em extrato metanólico da inflorescência de *Humulus lupulus* nas concentrações de 97,5 ppm, 195 ppm, 390 ppm sobre *Candida albicans*.

de lúpulo, comparada inclusive à atividade de griseofulvina contra *Trichophyton spp.* e bastante potente contra *Candida* e *Mucor*. O presente estudo,

contrariamente não pôde detectar atividade contra *C. albicans*. Uma explicação poderia ser uma alteração na estrutura do grupo acil- da molécula provocada pelo método de extração, desde que os autores relatam a importância desta estrutura na atividade antifúngica que encontraram (Mizobuchi e Sato 1985). No presente estudo, por se tratar de uma triagem preliminar, não foi realizado o isolamento de moléculas do extrato. Os testes feitos com moléculas isoladas, geralmente apresentam resultados mais promissores do que aqueles feitos com extrato bruto.

A maioria dos estudos avalia a atividade do lúpulo contra contaminantes de alimentos, principalmente bactérias, em amostras de pão ou cerveja. Nestes artigos, é notória a atividade do lúpulo contra a bactéria gram-positiva *Lactobacillus*, *Enterococcus* e *Pediococcus*. A atividade contra hifas contaminantes também é avaliada com importante atividade contra *Penicillium* e *Aspergillus* (Nionelli et al. 2018).

#### Sinergismo do extrato de lúpulo com antifúngicos

O extrato de *H. lupulus* também foi avaliado em combinação com antifúngicos amplamente empregados na terapia contra espécies de *Candida*, cetoconazol e cotrimaxol, para avaliar um potencial efeito sinérgico. Conforme ilustrado na figura 4 não há aumento da atividade inibitória das drogas utilizadas. Além disso foi possível notar um efeito antagonista do extrato de *H. lupulus* sobre o cetoconazol quando comparado ao controle.

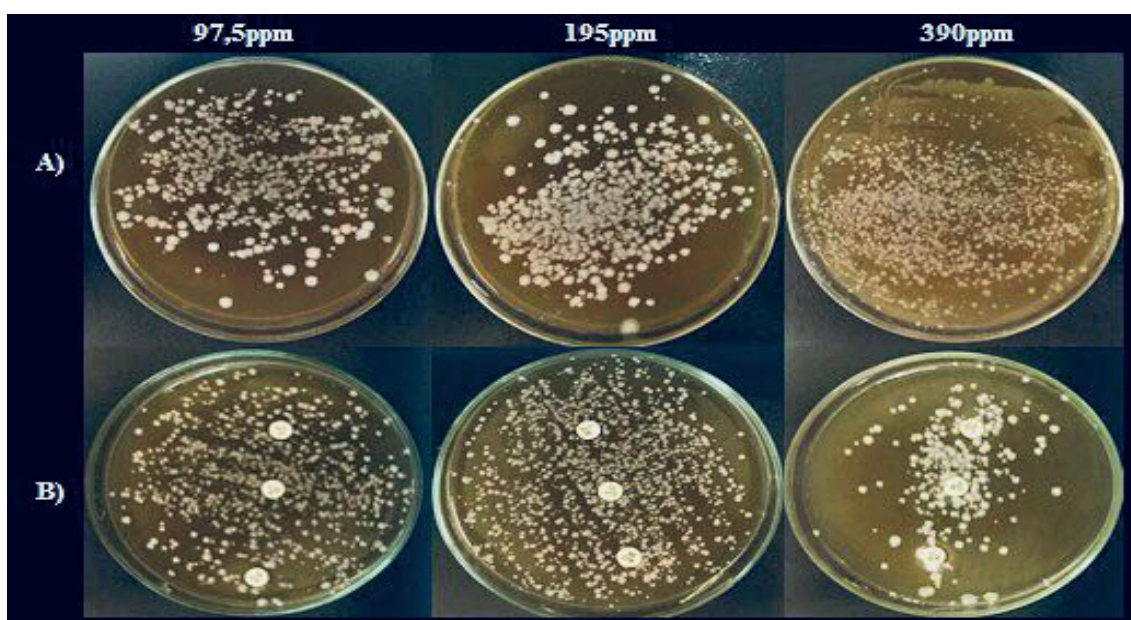
Também foi testado o cotrimaxol, porém o lúpulo não apresentou efeito sinérgico e nem antagônico.

Alguns estudos apresentaram efeito sinérgico do extrato de plantas e o antifúngico cotrimaxazol. O estudo de Almeida-Carlos (2016) revelou que associações dos extratos metanólicos de *Punica granatum* (romã), *Psidium guajava* (goiaba) e *Anacardium occidentale* (caju) com antibióticos padronizados, incluindo o cotrimaxazol, apresentaram uma potencialização do efeito antimicrobiano frente a bactérias Gram positivas, sugerindo efeito de sinergismo entre os mesmos, mas necessitando de confirmação em estudos complementares. Porém, o mesmo estudo não encontrou este efeito com bactérias Gram negativas ou fungos.

Um segundo estudo encontrou efeito sinérgico do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (Capim limão) sobre atividade de cotrimaxazol frente a *S. aureus*. Porém no presente estudo não foi observado efeito sinérgico do extrato de lúpulo em nenhuma das concentrações testadas (97,5 ppm; 195 ppm; 390 ppm) com o cotrimaxazol.

#### CONCLUSÃO

Desde que o lúpulo é usado como estabilizante microbiológico da cerveja em produção, impedindo o crescimento de microrganismos contaminantes, é válido avaliar sua atividade contra microrganismos que oferecem risco à saúde. Os estudos da atividade antifúngica do lúpulo



**FIGURA 4.** Teste de sinergismo com extrato metanólico e inflorescência de *Humulus Lupulus* utilizando cetoconazol e cotrimaxol. Onde (A) antifúngico cetoconazol na presença de diferentes concentrações de extrato metanólico de lúpulo (97,5 ppm; 195 ppm; 390 ppm). Em (B) cotrimaxazol na presença de diferentes concentrações de extrato metanólico de lúpulo (97,5 ppm; 195 ppm; 390 ppm).

são limitados à poucas espécies patogênicas de *Trichophyton sp.*, *Mucor rouxianus*, e *Fusarium oxysporum* (Bocquet et al. 2018). A literatura relata resultados conflitantes sobre a atividade do lúpulo contra *Candida sp.* No presente estudo não foi possível observar inibição do extrato metanólico de *H. lupulus* sobre os fungos do gênero *Candida* testados em três metodologias diferentes impactando no desenvolvimento de produtos farmacêuticos com este fim. A atividade da planta sobre outros microrganismos será avaliada e relatada futuramente.

**Financiamento:** Funadesp/UniEvangélica 2017/2018.

## REFERÊNCIAS

- Aghamiri V, Mirghafourvand M, Mohammad-Alizadeh-Charandabi S, Nazemiyeh H (2016) The effect of Hop (*Humulus lupulus* L.) on early menopausal symptoms and hot flashes: A randomized placebo-controlled trial. *Complement Ther Clin* 23:130–135. <https://doi.org/10.1016/j.ctcp.2015.05.001>
- Almeida LFD, Cavalcanti YW, Castro RD, Lima EO (2012) Atividade antifúngica de óleos essenciais frente a amostras clínicas de *Candida albicans* isoladas de pacientes HIV positivos. *Rev Bras Plantas Med* 14(4):649–655. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722012000400012>
- Bocquet L, Sahpaz S, Rivière C (2018) An Overview of the Antimicrobial Properties of Hop. In: Mérillon JM., Riviere C. (eds) *Natural Antimicrobial Agents: Sustainable Development and Biodiversity*, v 19. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-67045-4\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-67045-4_2)
- Chadwick LR, Pauli GF, Farnsworth NR (2006) The pharmacognosy of *Humulus lupulus* L. (hops) with an emphasis on estrogenic properties. *Phytomedicine* 13(1–2): 119–131 <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2004.07.006>.
- Costa CR (2009) *Candida* virulence factors of immunocompromised patients. Molecular characterization of *Candida albicans* resistant and susceptible to fluconazole. 2009. 77 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia – GO, Brasil.
- Demitto FO, Amaral RCR, Biasi RP e Guilhermetti E (2012) Suscetibilidade a antifúngicos *in vitro* de *Candida* spp. em pacientes do Hospital Universitário Regional de Maringá-PR. *J Bras Patol Med Lab.* <https://doi.org/10.1590/S1676-24442012000500003>
- Dutra FSG, Carlos LA, da Motta OV, Vianna AP, Pereira SMF (2016) Atividade antimicrobiana de extratos vegetais frente à bactérias de importância médica. *Biol Saude* 6(20). <https://doi.org/10.25242/88686202016965>
- Gerhäuser C (2005a) Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. *Eur J Cancer* 41(13):1941–54. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2005.04.012>
- Gerhäuser C (2005b) Broad spectrum anti-infective potential of xanthohumol from hop (*Humulus lupulus* L.) in comparison with activities of other hop constituents and xanthohumol metabolites. *Mol Nutr Food Res* 49(9):827–831. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200500091>
- Karkowska-Kuleta J, Rapala-Kozik M, Kozik A (2009) Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochim Pol* 56(2):211–24.
- Keiler AM, Zierau O, Kretzschmar G (2013). Hop extracts and hop substances in treatment of menopausal complaints. *Planta Medica* 79(7):576–579. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1328330>
- Mardegan RC, Klein MI, Golvea MB, Rodrigues JAO, Gonçalves RB e Höfling JF (2006) Biotyping and genotypic diversity among oral *Candida albicans* strains from caries-free and caries-active healthy children. *Braz J Microbiol* 37(1):26–32 <https://doi.org/10.1590/S1517-83822006000100005>
- Mizobuchi S, Sato Y (1985) Antifungal activities of hop bitter resins and related compounds. *Agr Biol Chem Tokyo* 49(2):399–403. <https://doi.org/10.1080/00021369.1985.10866749>.
- Nionelli L, Pontonio E, Gobbetti M, Rizzello CG (2018) Use of hop extract as antifungal ingredient for bread making and selection of autochthonous resistant starters for sourdough fermentation. *Int J Food Microbiol* 266:173–182. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.12.002>.
- Oliveira RDR, Maffei CML, Martinez R (2001) Infecção urinária hospitalar por leveduras do gênero *Candida*. *Rev Assoc Med Bras* 47(3):231–235. <https://doi.org/10.1590/S0104-42302001000300035>
- Nowack LD, Silva MLC, Guimarães LM, Cezar LP, Nogueira AL, Freire NMS (2009) Epidemiological and clinical aspects study and therapeutic actualization of vulvovaginitis by *Candida* sp., *Trichomonas vaginalis* and bacterial vaginosis by *Gardnerella vaginalis*. *J Bras Med* 77(5/6):46–50.
- Royle D. (1992) Hops. By R. A. Neve. London: Chapman and Hall, (1991), pp. 266, *Exp Agric* 28(1):123–124. <https://doi.org/10.1017/S0014479700023085>.
- Sá MCN, Sousa HR, Amaro CSO, Pinheiro DN, Oliveira MMM, Pinheiro MCN (2014) Isolamento de *Candida* no esfregaço cervico-vaginal de mulheres não gestantes residentes em área ribeirinha do Estado do Maranhão, Brasil, 2012. *Rev Pan-Amaz Saude* 5(1):25–34. <http://dx.doi.org/10.5123/S2176-62232014000100003>.
- Saugspier M, Dorn C, Czech B, Gehrig M, Heilmann J, Hellerbrand C (2012) Hop bitter acids inhibit tumorigenicity of hepatocellular carcinoma cells *in vitro*. *Oncol Rep* 28:1423–1428. <https://doi.org/10.3892/or.2012.1925>
- Small, E. (1978). A numerical and nomenclatural analysis of morpho-geographic taxa of *Humulus*. *Syst Bot* 3(1):37–76. <https://doi.org/10.2307/2418532>
- Sumiyoshi M, Kimura Y (2013) Hop (*Humulus lupulus* L.) extract inhibits obesity in mice fed a high-fat diet over the long term. *Br J Nutr* 109(1):162–172. <https://doi.org/10.1017/S000711451200061X>
- Tabata N, Ito M, Tomoda H e Omura S (1997). Xanthohumols, diacylglycerol acyltransferase inhibitors, from *Humulus lupulus*. *Phytochemistry* 46(4):683–687. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(97\)00157-x](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(97)00157-x).
- Taira DL, Chang MR (2011) Atividade enzimática e susceptibilidade antifúngica de *Candida* spp. isoladas de pacientes com candidemia em hospital universitário de

- Campo Grande-MS, 1998-2010. 2011. 60 f. Dissertação (Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias) Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande – MS, Brasil.
- Teuber M, Schmalreck AF (1973) Membrane leakage in *Bacillus subtilis* 168 induced by the hop constituents lupulone, humulone, isohumulone and humulinic acid. *Archiv Mikrobiol* 94:159–171. <https://doi.org/10.1007/BF00416690>.
- Zanoli P, Zavatti M, Rivasi M, Brusiani F, Losi G, Puia G, Avallone R, Baraldi M (2007) Evidence that the beta-acids fraction of hops reduces central GABAergic neurotransmission. *J Ethnopharmacol* 109(1):87–92. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.07.008>
- Zhao F, Nozawa H, Daikonya A, Kondo K e Kitanaka S (2003) Inhibitors of nitric oxide production from hops (*Humulus lupulus* L.). *Biol Pharm Bull* 26(1):61–65. <https://doi.org/10.1248/bpb.26.61>.